

# **Influencia del estrés abiótico y biótico sobre la composición de la pared celular de *Lotus tenuis***

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias*

**María Elena Vago**

Ingeniera en Producción Agropecuaria

Universidad Católica Argentina

1992

Lugar de trabajo: Universidad Católica Argentina, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Laboratorio de Evaluación de alimentos para uso animal  
Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Cátedras Química de Biomoléculas y de Bioquímica

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Jorge Zavala**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)  
Doctor (Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany)

Co-director

**Marina Ciancia**

Licenciada en Ciencias Químicas (UBA)  
Doctora de la Universidad de Buenos Aires (UBA)

Consejero de Estudios

**Gustavo Jaurena**

Ingeniero Agrónomo, orientado en Zootecnia (FAUBA)  
Doctor of Philosophy (University of Wales)

## JURADO DE TESIS

JURADO

**Pedro Marcos Civello**

Bioquímico (FCE-UNLP)  
Doctor en Ciencias Bioquímicas (FCE-UNLP)

JURADO

**Nora Marta Andrea Ponce**

Farmacéutica (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)  
Doctor en Farmacia (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

JURADO

**Oscar Adolfo Ruiz**

Bioquímico Universidad Nacional del Nordeste  
Doctor en Bioquímica (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 02 de Septiembre de 2019



**Dedicatoria**

Muy especialmente a Rolo, Matías y María por su apoyo incondicional y por el tiempo que les robé por un sueño.

A mis padres porque me dieron alas y confianza para emprender los sueños aunque una parte de ellos no esté hoy...A mis hermanos por estar ahí.

A Marina y Marilin, a Jorge y a Gustavo por la confianza y el empuje.

También agradecerles a:

Virginia

Martin

Franco

Yasmine, especialmente

Lucía

Juan Pablo

Francisco

Pato

Paula

Lorena

Julieta

Caterina

Valeria

Adriana

Lupi

Laura

Agustín

Juan

Luciano

Carlos

Hugo

Alberto

Luis

Lorena

Liliana

Vanesa

Marisa W

Jorge C

Stella A, Paula y las chicas de Industrias

Porque todos ayudaron a a llevar adelante este proyecto

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ABREVIATURAS .....	XIX
RESUMEN .....	XX
ABSTRACT .....	XXI
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	22
1.1 Problemas y antecedentes.....	22
1.2 Efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular.....	28
1.3. Contextualización geográfica: Depresión del Salado.....	33
1.4. <i>Lotus tenuis</i> como modelo para el estudio del efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular.....	36
1.5. Objetivos e hipótesis de trabajo. ....	42
1.5.1 Objetivo general: .....	42
1.5.2 Objetivos específicos.....	42
1.5.3 Hipotesis de trabajo.....	43
2. Capítulo 2 Materiales y métodos.....	45
2.1. Material utilizado.....	45
2.2.1 Germinación, bandejas y transplante en macetas.....	46
2.2.2 Tratamientos realizados.....	47
2.2.3 Medición de variables del ambiente.....	51
2.2.4 Estudios anatómicos estructurales. Observaciones con microscopía óptico (MO):.....	52
2.2.5 Determinación de parámetros nutricionales.....	53
2.2.6 Extracciones de polisacáridos de la pared celular.....	54
2.2.7 Métodos generales de análisis de componentes de la pared.....	57
2.2.7.1. Determinaciones colorimétricas del contenido en hidratos de carbono totales y el contenido de ácidos urónicos.....	57
2.2.7.2. Determinación de la composición en monosacáridos neutros.....	57
2.2.8 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA).....	61
3.Capítulo 3 Morfología y respuestas morfofisiológicas resultantes del estrés abiótico salino y biótico.....	63
3.1 Introducción.....	63
3.2 Objetivos específicos.....	64
3.2.1 Hipótesis de trabajo:.....	64
3.3 Materiales y métodos:.....	65
3.4 Resultados.....	68
3.4.1 Estudio exomorfológico.....	68
3.4.1.a Estudio exomorfológico de las plantas sometidas al estrés salino.....	68
3.4.1.a.1 Análisis de los parámetros de crecimiento evaluados.....	68
3.4.1.a.1.1 Porcentaje de materia seca de tallos y hojas.....	68
3.4.1.a.1.2 Gramos de materia seca de tallos y hojas por planta.....	69

3.4.1.a.1.3 Gramos de biomasa de tallos y hojas por planta.....	69
3.4.1.a.1.4 Porcentaje de materia seca de raíz.....	70
3.4.1.a.1.5 Gramos de materia seca de raíz por planta.....	71
3.4.1.a.1.6 Gramos de biomasa de raíz por planta.....	71
3.4.1.a.1.7 Longitud de los tallos.....	72
3.4.1.a.1.8 Cantidad de ramificaciones por planta.....	73
3.4.1.a.1.9 Largo de la raíz en centímetros.....	73
3.4.1.b Estudio exomorfológico de las plantas sometidas al estrés biótico.....	74
3.4.1.b.1 Análisis de los parámetros de crecimiento evaluados.....	74
3.4.1.b.1.1 Porcentaje de materia seca y gramos de materia seca de tallos y hojas...	75
3.4.1.b.1.2 Gramos de biomasa de tallos y hojas.....	76
3.4.2 Estudio anatómico estructural.....	77
3.4.2.a Estrés abiótico salino: Observaciones con microscopio óptico.....	77
3.4.2.a.1 Observaciones de los tallos en corte transversa.....	77
3.4.2.a.2 Observaciones de los folíolos en corte transversal.....	86
3.4.2.a.3 Observaciones de las raíces en corte transversal.....	94
3.4.2.b.1 Estrés biótico producido por trips.....	107
3.4.2.b.1 Exomorfolología y observaciones con microscopía óptica.....	107
3.5 Discusión.....	110
3.5.1 Consideraciones sobre parámetros de crecimiento, exomorfolología y anatomía frente al estrés salino y a la herbivoría.....	110
3.5.2 Consideraciones sobre los parámetros anatómico estructurales respecto al estrés salino y biótico producido por trips.....	113
3.6 Conclusiones.....	116
4. Capítulo 4 Respuestas químicas de la pared celular frente al estrés salino y respuestas químicas hormonales y nutricionales.....	119
4.1 Introducción.....	119
4.2 Objetivos.....	119
4.2.1 Hipótesis de trabajo.....	120
4.3 Materiales y métodos.....	121
4.3.1 Determinación de parámetros nutricionales.....	122
4.3.2 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA).....	123
4.3.3 Extracción de polisacáridos de la pared celular.....	123
4.3.4 Métodos generales de análisis de componentes de la pared.....	124
4.3.4.1 Determinaciones colorimétricas del contenido en hidratos de carbono totales y el contenido de ácidos urónicos.....	124
4.3.4.2. Determinación de la composición en monosacáridos neutros.....	124
4.4 Resultados.....	126
4.4.1 Observaciones respecto a los parámetros nutricionales evaluados.....	127
4.4.1.1 Parámetros nutricionales evaluados en tallos.....	127
4.4.1.2 Parámetros nutricionales evaluados en hojas.....	129
4.4.2 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA)), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA).....	133
4.4.3 Estudios de polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas.....	135

4.4.3.1 Extracción secuencial de los polisacáridos de paredes celulares de tallos.....	138
4.4.3.1.1 Experimentos preliminares.....	138
4.4.3.1.2 Estudio de los extractos obtenidos a partir de tallos.....	141
4.4.3.1.3 Extracciones de polisacáridos de la pared celular de hojas.....	147
4.4.3.2 Análisis de los resultados obtenidos a partir de la secuencia extractiva de los polisacáridos en relación a las determinaciones nutricionales realizadas sobre el residuo insoluble en alcohol (RIA).....	150
4.5 Discusión.....	151
4.5.1 Consideraciones respecto a los parámetros nutricionales analizados.....	151
4.5.2 Consideraciones respecto a los parámetros hormonales analizados.....	155
4.5.3 Consideraciones respecto a los estudios de polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas.....	156
4.5.3.1 Comparación entre los polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas.....	156
4.6 Conclusiones.....	159
5 Capítulo 5 Respuestas químicas de la pared celular frente al estrés biótico producido por trips, respuestas hormonales y nutricionales.....	161
5.1 Introducción.....	161
5.2 Objetivos.....	164
5.2.1 Objetivos específicos.....	164
5.2.2 Hipótesis de trabajo:.....	164
5.3 Materiales y métodos:.....	165
5.4 Resultados.....	167
5.4.1 Estudios de parámetros nutricionales.....	167
5.4.2 Estudio de parámetros hormonales.....	168
5.4.3 Resultados de los estudios de polisacáridos de paredes celulares de hojas.....	170
5.4.3.1 Porcentajes de polisacáridos de paredes celulares en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva.....	170
5.4.3.2 Composición de los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva.....	172
5.4.3.3 Análisis de los resultados obtenidos a partir de la secuencia extractiva de los polisacáridos.....	176
5.5 Discusión.....	178
5.6 Conclusiones.....	181
6. Capítulo 6 Consideraciones finales.....	183
6.1 En relación a las hipótesis planteadas.....	183
6.2 Discusión de los resultados de la tesis.....	190
6.3 Perspectivas derivadas.....	194
7.0 Bibliografía.....	196
8.0 Apéndice.....	213

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición porcentual en hemicelulosa, lignina, celulosa, proteína bruta, cenizas y nitrógeno insoluble en detergente ácido de hojas de *Lotus tenuis* del genotipo tolerante de acuerdo a la dosis de sal en el agua de riego.

Cuadro 2 A y B: Resultado de las determinaciones realizadas sobre los RIA de hojas testigo de las plantas tolerantes (HTT, muestra A) y de las plantas susceptibles tratadas con 150 mM NaCl (HD2S, muestra B) en dos condiciones diferentes: 1) al ser extraídas con agua a ebullición ( $H_2O\emptyset$ ) y 2) al ser tratadas con  $\alpha$ -amilasa.

Cuadro 3: Composición de monosacáridos en moles % de los residuos obtenidos luego de las extracciones acuosas de los tallos de *Lotus tenuis* correspondientes a la FMH 490 o tolerante y las FMH 2241 o susceptible testigos y las regadas con la dosis 2 de 150 mM de NaCl.

Cuadro 4: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos acuosos 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 5: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de CDTA 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 6: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de  $Na_2CO_3$  1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 7: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 1M 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 8: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 4M 1 - 2 y 3 y el residuo final obtenido de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 9: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos acuosos 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos. Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 10: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de CDTA 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 11: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 12: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 1M 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 13: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 4 M 1-2 y 3 y del residuo de las hojas de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Cuadro 14: Rendimiento obtenido en tallos testigo tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

Cuadro 15: Rendimiento obtenido en tallos dosis 1 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

Cuadro 16: Rendimiento obtenido en tallos dosis 2 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

Cuadro 17: Rendimiento obtenido en hojas testigo tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

Cuadro 18: Rendimiento obtenido en hojas dosis 1 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

Cuadro 19: Rendimiento obtenido en hojas dosis 2 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias  $\pm$  DE.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de una cadena de celulosa.

Figura 2: Estructura de un xiloglucano, con detalle de la cadena principal formada por D-glucosa unidas  $\beta$  1-4 con ramificaciones de D-xilosa  $\alpha$ 1-6.

Figura 3: Estructura de las pectinas. Homogalacturonano.

Figura 4: Estructura de una pectina. Ramno galactouronano I y II

Figura 5: Modelo molecular a escala de la pared celular de una hoja de *Arabidopsis*. La cantidad de cada polímero se basa en su razón respecto del contenido de celulosa. La cantidad de celulosa representada es menor a la real, para mayor claridad del esquema. XG: xiloglucanos, GAX: glucuronoarabinosilanos, RGII: ramnogalacturonano II, RGI: ramnogalacturonano I, HG: homogalacturonano. Tomado de Somerville et al. 2004.

Figura 6: Región pampeana argentina. A: esquema de las subregiones de la región pampeana argentina. (A): Pampa Ondulada; (B): Pampa Interior; (C): Pampa Austral y (D): Pampa Deprimida. B: imagen que muestra en diferentes colores, las comunidades potenciales de pastizales distribuidas según las características geomorfológicas. En azul, las zonas inundables de praderas húmedas de mesófitas y de hidrófilas, en rojo, estepas de halófitas y en verde, praderas de mesófitas. (Adaptado de Burkart et al., 2005) (Antonelli 2017).

Figura 7 a-b-c: a) Caja de Petri con las semillas b) Bandejas de germinación c) Vista de las plantas colocadas en las macetas y en las bandejas.

Figura 8 a y b: a) Vista de las plantas en el invernáculo b) Vista de las plantas cosechadas en el laboratorio antes de realizar las mediciones.

Figura 9 Extracción secuencial de pared celular. las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos indicados. Los números entre paréntesis indican el número de extracciones secuenciales realizadas con cada solvente.

Figura 10 a-b-c: a) extracción acuosa con temperatura; b) proceso de diálisis de los residuos y los extractos obtenidos; c) proceso de liofilizado del material obtenido en las extracciones.

Figura 11: Cromatograma de una mezcla de patrones indicando en cada pico el monosacárido correspondiente.

Figura 12: Esquema del experimento para evaluar el efecto del estrés abiótico salino producido en plantas de *Lotus tenuis* que presentaban distinta tolerancia frente al estrés. Imágenes a-d: a: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas; d: vista general del experimento bajo invernáculo; e: aspecto general de las plantas cosechadas.



Figura 13: Porcentaje de MS de tallo y hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 14: Gramos de MS por planta de tallos y hojas por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 15: Gramos de biomasa de tallos y hojas por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 16: Porcentaje de MS de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 17: Gramos de MS de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 18: Gramos de biomasa de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 19: Longitud de los tallos en centímetros para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 20: Cantidad de ramificaciones por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 21: Largo de la raíz en centímetros para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 22: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Aspecto general de las plantas: A-C, Genotipo Tolerante A: testigo tolerante, B: dosis 1 tolerante, C: dosis 2 tolerante; D-E, Genotipo susceptible, D: testigo susceptible, E: dosis 1 susceptible, F: dosis 2 susceptible. Escalas A-F: 30 cm.

Figura 23: Porcentaje de materia seca de tallos y hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 24: Gramos de materia seca de tallos y de hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 25: Gramos de biomasa de tallos y hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 26: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Ataque de trips. Experimento 2013-2016: A-B, macetas con cobertura en el invernáculo: A, aspecto general de las plantas jóvenes con cobertura, B; detalle de las plantas en estado avanzado de crecimiento; C, trampa de captura con trips; D, planta atacada con trips, aspecto general; E-F: hojas atacadas.

Figura 27: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

Figura 28: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-F, detalles. Asterisco (\*): cambium; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B-F=50  $\mu$ m.

Figura 29: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-F, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B-F=50  $\mu$ m.

Figura 30: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Tallo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B, detalle. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A= 200  $\mu$ m; B= 50  $\mu$ m.

Figura 31: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A= 200  $\mu$ m; B-D= 50  $\mu$ m.

Figura 32: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B, detalle. Asterisco (\*): cambium; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema Escalas A=200  $\mu$ m; B=50  $\mu$ m.

Figura 33: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. L. glaber) Experimento 2013. Tallo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalle. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

Figura 34: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

Figura 35: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A=200 µm; B-C=50 µm.

Figura 36: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Hoja Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A-B=50 µm.

Figura 37: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A=200 µm; B-C=50 µm.

Figura 38: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Folíolo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO. A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas= 50 µm.

Figura 39: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200 µm; B-E=50 µm.

Figura 40: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas=50 µm.

Figura 41: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200 µm; B-C=50 µm.

Figura 42: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013 Folíolo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas=50 µm.

Figura 43: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; fl: floema; hv: haz vascular; x: xilema. Escalas A=200 µm; B-E=50 µm.

Figura 44: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D: detalles.

Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200  $\mu$ m, B: 75  $\mu$ m; C: 130  $\mu$ m; D=80  $\mu$ m.

Figura 45: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; rd: radio; ☉: tejido muerto; x: xilema secundario. Escalas A-B=50  $\mu$ m.

Figura 46: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-B=200  $\mu$ m.

Figura 47: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio secundario; x: xilema; x1: xilema primario. Escalas A=200  $\mu$ m; B-E=50  $\mu$ m.

Figura 48: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-E, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-E=50  $\mu$ m.

Figura 49: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; C-D, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-B=200  $\mu$ m; C-D=50  $\mu$ m.

Figura 50: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ☉: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A= 200 $\mu$ m B-D=50  $\mu$ m

Figura 51: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. a: almidón; f: fibras; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A-B=50  $\mu$ m.

Figura 52: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200  $\mu$ m; B-C=50  $\mu$ m.

Figura 53: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; C-F, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A-B=200  $\mu$ m; C-F=50  $\mu$ m.

Figura 54: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. a: almidón; f: fibras; pd: peridermis; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

Figura 55: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Ataque de trips. Experimento 2013. Folíolos (CT), fotomicrografías con MO: A-C: FMH 2241: A-B, aspectos generales; C, detalle; D, FMH 490 detalle. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200; B= 50  $\mu$ m; C-D=75  $\mu$ m.

Figura 56: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber). Ataque de trips. Experimento 2013. Folíolos (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A, C= 50  $\mu$ m; B= 25.

Figura 57: Esquema del experimento para evaluar el efecto del estrés abiótico salino producido en plantas de *Lotus tenuis* que presentaban distinta tolerancia frente al estrés. Imágenes a-d: a: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas; d: vista general del experimento bajo invernáculo; e: aspecto general de las plantas cosechadas

Figura 58: Extracción secuencial de pared celular. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos indicados. Los números entre paréntesis indican el número de extracciones secuenciales realizadas con cada solvente.

Figura 59: Porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) en tallos para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 60: Porcentaje de fibra detergente ácido (FDA) en tallos para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 61: Porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) en hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 62: Porcentaje de fibra detergente ácido (FDA) en hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 63: Mediana del volumen de gas acumulado por gramo de materia seca incubada de muestras de pared celular de tallos y hojas de la FMH 490.

Figura 64: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 65: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de ácido jasmónico - isoleucina y ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 66: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de ácido indol-acético y ácido abscísico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 67 A: Resultado de las determinaciones realizadas sobre la muestra A de hojas de plantas testigos al ser extraídas con agua a ebullición y con alfa amilasa.

Figura 67 B: Resultado de las determinaciones realizadas sobre la muestra Q de hojas de plantas susceptibles regadas con la dosis 150 mM ClNa al ser extraídas con agua a ebullición y con alfa amilasa.

Figura 68: Porcentaje de residuo insoluble en alcohol (AIR) obtenido de tallos de la FMH 490 o Tolerante y de la FMH 2241 o Susceptible para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 69: Porcentaje de extractos obtenidos en la extracción con alcohol, acetona y éter (AIR) de tallos de la FMH 490 o Tolerante y de la FMH 2241 o Susceptible para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 70 Porcentaje de residuo obtenido de tallos para cada tratamiento salino luego de dos extracciones con agua caliente. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 71: Porcentaje de extracto obtenido de tallos para cada tratamiento salino luego de dos extracciones con agua caliente. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 72: Esquema de los componentes moleculares inducidos como respuesta a la herbivoría producida por trips (Steenbergen et al 2018).

Figura 73 Esquema del experimento realizado para evaluar el efecto del estrés biótico producido por *Caliothrips phaseoli* en plantas de *Lotus tenuis* bajo invernáculo. Imágenes a-d: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas bajo la carpa de tul; d: aspecto general de las plantas

Figura 74: Porcentaje de Fibra detergente neutro y fibra detergente ácido en respuesta al estrés biótico producido por trips determinado por el sistema de detergentes de Van Soest. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 75: Porcentaje de lignina, hemicelulosas y celulosas en respuesta al estrés biótico producido por trips determinado por el sistema de detergentes de Van Soest. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 76: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

Figura 77: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de ácido jasmónico - isoleucina y ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

Figura 78: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de ácido indol-acético y ácido abscísico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

Figura 79: Porcentajes de polisacáridos de paredes celulares de hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. A. Extractos obtenidos con: agua caliente, soluciones de CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). B. Soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final (RF). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 80: Porcentajes de polisacáridos de reserva (almidón) en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva de las hojas utilizando agua caliente, CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 81: Porcentajes de monosacáridos neutros y ácidos urónicos en hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. A. Extractos obtenidos con: agua caliente, soluciones de CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). B. Soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final (RF). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 82: Composición en monosacáridos en los extractos obtenidos de hojas de plantas de *L. tenuis* sometidas a estrés biótico por ataque de trips y hojas de plantas control. A-D Primeros extractos (extracción con agua caliente, soluciones acuosas de CDTA y carbonato de sodio): A. El contenido de glucosa relacionado en forma directa con los  $\alpha$ -glucanos de reserva (almidón). B. Contenido de ramnosa (Rha) y fucosa (Fuc). C. Contenido de arabinosa (Ara) y xilosa (Xyl). D. Contenido de manosa (Man) y galactosa (Gal). E-G Extractos obtenidos con soluciones fuertemente alcalinas (KOH 1M e KOH 4M) y residuo final del proceso extractivo: E. Contenido de ramnosa (Rha) y fucosa (Fuc). F. Contenido de arabinosa (Ara) y xilosa (Xyl). D. Contenido de manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc).

Figura 83 Gramos de materia seca obtenidos en los residuos correspondientes a las extracciones de alcohol-acetona-eter(RIA y en los residuos y en los extractos correspondientes a la secuencia extractiva con agua caliente, en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 84: Gramos de materia seca obtenidos en los residuos y en los extractos correspondientes a las extracciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Figura 85: Gramos de materia seca obtenidos en los residuos y en los extractos correspondientes a las extracciones de KOH 1M y 4M, en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).



## ABREVIATURAS

ABA: ácido absícico  
Ara: arabinosa  
CG: Cromatografía gaseosa  
CT: corte transversal  
D1S: dosis 1 susceptible  
D1T: dosis 1 tolerante  
D2S: dosis 2 susceptible  
D2T: dosis 2 tolerante  
DAMPs: patrones moleculares asociados al daño mecánico  
EACs: compuestos asociados a la oviposición de insectos  
FDA: fibra detergente ácido  
FDN: fibra detergente neutro  
FMH: Familia de medios hermanos  
Fuc: fucosa  
Gal: galactosa  
GalA: ácido galacturónico  
GAX: glucuronoarabinosilanos  
Glu: glucosa  
HAMPs: patrones moleculares asociados al herbívoro aggressor  
HG: homogalacturonano  
IAA: ácido indol acético  
JA: ácido jasmónico  
JA-Ile: Jasmónico isoleucina  
Man: manosa  
MO: microscopía óptica  
MS: materia seca  
PG: poder germinativo  
PM: Peso molecular  
RIA: residuo insoluble en alcohol  
RGI: ramnogalacturonano I  
RGII: ramnogalacturonano II  
Rha: ramnosa  
ROS: Especies de reactivas del oxígeno  
SA: ácido salicílico  
TS: testigo susceptible  
TT: testigo tolerante  
VOCs: compuestos volátiles orgánicos  
XG: xiloglucanos  
Xyl: xilosa

## **Influencia del estrés abiótico y biótico sobre la composición de la pared celular de *Lotus tenuis***

Las paredes celulares de las plantas se comportan como una matriz químicamente dinámica. Las respuestas bioquímicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en cambios a nivel celular, que generan señales sistémicas emanadas de los sitios afectados y pueden modificar la composición química de las paredes celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del estrés abiótico salino y del estrés biótico producido por *Caliothrips phaseoli* sobre la composición de las paredes celulares de hojas y tallos de la especie forrajera *Lotus tenuis*. Debido a la importancia de esta especie en la alimentación de rumiantes en pastoreo en zonas marginales, se utilizó el sistema de detergentes de Van Soest y los resultados obtenidos se compararon con una metodología más específica de extracción secuencial de polisacáridos que se caracterizaron, permitiendo así explicar a nivel estructural algunas diferencias observadas en los parámetros medidos en diferentes condiciones de crecimiento de las plantas. Además, se cuantificaron hormonas que pudieran modular la respuesta frente a estos estreses a nivel de paredes celulares. Respecto al estrés salino, se concluyó que, si bien las plantas veían afectado su crecimiento en forma negativa por efecto de la sal en el agua de riego y este efecto era dependiente de la concentración de sal para algunos de los parámetros analizados, las plantas estresadas producían una mayor proporción de polisacáridos solubles, tanto  $\alpha$ -glucanos, como pectinas, más fácilmente degradables, principalmente en tallos, por lo que serían más digestibles para los rumiantes. El laborioso método utilizado brindó valiosa información respecto al tipo de polisacáridos obtenidos que podría utilizarse en programas de mejoramiento genético vegetal. Respecto al estrés biótico, los efectos observados fueron mucho menores en las condiciones ensayadas, pero se pudieron detectar diferencias en la fracción correspondiente a hemicelulosas debidas al estrés.

**Palabras clave:** Leguminosa forrajera, pectina, hemicelulosa,  $\alpha$ -glucano, salinidad, herbivoría por trips

### **Influence of abiotic and biotic stress on cell wall composition of *Lotus tenuis***

Plant cell walls behave as a chemically dynamic matrix. Plants biochemical responses towards different stress types are based in changes at a cellular level, that generate systemic signals coming from the affected sites that may modify the chemical composition of the cell walls. The aims of this work was to evaluate the influence of saline abiotic stress and of the biotic stress produced by *Caliothrips phaseoli* on the composition of the cell walls of leaves and stems from the forage species *Lotus tenuis*. Due to the importance of this species in feeding grassing ruminants from marginal regions, the detergent system of Van Soest was used, and the results obtained were compared with those from a more specific methodology, comprising sequential extraction of polysaccharides, which were characterized, allowing to draw an explanation at a structural level of some differences observed in the parameters measured in different growing conditions of the plants. Besides, hormones that could modulate the response to these stresses at a cell wall level were quantified. Regards the salt stress, it was concluded that, although plants were affected negatively in their growth by the effect of salt in the irrigation water, and this effect was concentration dependent for some of the measured parameters, the stressed plants produced higher amounts of soluble polysaccharides,  $\alpha$ -glucans, as well as pectins which are easier to digest, mainly in stems, so they would be more digestible for ruminants. This hard working (laborious) method gave valuable information respect the type of polysaccharides obtained, and this information could be used for genetic improvement programs. Regards the biotic stress, the effects were less important in the conditions assayed, but differences due to stress could be detected in the hemicellulosic fractions.

**Key words:** *Fodder legume*, salinity, biotic stress, pectin,  $\alpha$ -glucan, thrips herbivory.

## Capítulo 1. Introducción General

- **Problema y antecedentes:**

Cuando las plantas se ven afectadas por situaciones desfavorables para su desarrollo producidas por condiciones de estrés abiótico o biótico, retardan su crecimiento y su productividad. El metabolismo vegetal se ve perturbado, ya sea por inhibición de enzimas metabólicas, menor cantidad de sustratos, demanda excesiva de ciertos compuestos metabólicos o por una combinación de todos estos factores. Las plantas han desarrollado estrategias anatómicas y químicas para resistir estas adversidades (Striker et al. 2011; Obata 2012; Krauss et al. 2014). A diferencia de los animales, las respuestas inmunológicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en la respuesta de cada célula y señales sistémicas emanadas de los sitios afectados (Dangl 2001; Ausubel 2005; Jones 2006). Gran parte de estas resistencias se deben a sus paredes celulares, cuya función es dar forma, rigidez, resistencia mecánica y protección frente a organismos patógenos, depredadores y adversidades medioambientales (Brett 1990; Buxton 1993; Somerville et al. 2004, Kesten et al. 2017). Por otra parte, las características químicas de las paredes celulares determinan la digestibilidad de las hojas y tallos, y son un aspecto fundamental de la calidad de las plantas como forrajes (Minson 1990; Van Soest, 1994; Hayashi et al. 2005).

En la presente tesis se trabajó con *Lotus tenuis*, que es una especie muy importante en la región de la Pampa Deprimida como resultado de su amplia plasticidad de desarrollo en distintas condiciones de estrés salino, encharcamiento y herbivoría. Asimismo, ha demostrado tolerancia a los suelos alcalinos, ya que puede crecer a pH=6-9 (Escaray et al. 2012). Aunque son varios los trabajos publicados que analizan el impacto de los estreses bióticos y abióticos sobre el metabolismo celular y sus efectos sobre el

crecimiento y desarrollo de las plantas (Munns 2008; Sanchez et al. 2008, 2010; Manchanda 2008; Teakle et al. 2010; Araujo et al. 2018), es mucho menos lo que se sabe respecto a cambios químicos en la estructura de los polisacáridos y sus consecuencias sobre las paredes celulares de *L. tenuis*. Cambios en la composición y morfología de las paredes celulares de esta forrajera podrían contribuir a explicar la tolerancia de la especie a dichos estreses. Asimismo, aportarían datos útiles aplicables a la interpretación del posible efecto sobre la herbivoría en las plantas ensayadas.

- **Antecedentes:**

Las plantas terrestres presentan una pared celular con algunas características básicas que se han mantenido a lo largo de la evolución, siendo su componente principal, la celulosa. Las paredes celulares primarias presentan grosor variable, son delgadas a gruesas, no lignificadas y dinámicas, es decir, van cambiando a medida que las células crecen y adquieren una determinada forma relacionada a sus funciones específicas (Braidwood et al. 2013). Cuando dejan de crecer, puede comenzar a desarrollarse una pared secundaria (Albersheim 2011).

El modelo actualmente aceptado para las paredes celulares primarias de plantas vasculares es el propuesto por Carpita y Gibeaut (Carpita y Gibeaut 1993; McCann y Carpita 2008). Las paredes celulares primarias de las dicotiledóneas, como *Lotus tenuis*, están formadas por un dominio de microfibrillas de celulosa que forman una red tridimensional con los xiloglucanos (hemicelulosas). Este dominio está embebido en una red de pectinas, que predominan en los espacios intercelulares y la lámina media. A su vez, existe otro dominio superpuesto formado por proteínas y glicoproteínas estructurales de varios tipos (Somerville et al. 2004; Albersheim 2011). Estas estructuras forman las paredes primarias y secundarias. Las paredes celulares de varias especies de leguminosas, como arveja, garbanzo, poroto, haba, alfalfa y soja, ya han sido estudiadas debido a su

alta importancia económica (Albersheim 2011). En particular, en la pared celular de estas plantas se pueden distinguir dos dominios de polisacáridos: a-Un dominio fibrilar, en el que predomina la celulosa, cuyas microfibrillas pueden estar interconectadas entre sí por diferentes tipos de hemicelulosas y b-Un segundo dominio formado por polisacáridos amorfos con gran capacidad de retención de agua, las pectinas (Painter 1983; Buchanan 2000).

La celulosa es un polisacárido componente estructural clave de las paredes celulares vegetales. Es muy estable y muy poco soluble. Respecto a su composición y enlaces, su estructura es simple. Está formada por cadenas lineales de  $\beta$ -1,4-glucanos. El tipo de unión  $\beta$ -1,4 requiere que alternadamente una glucosa esté girada  $180^\circ$  respecto a la anterior dando una estructura disacáridica repetitiva, la celobiosas. Estas cadenas lineales se unen por uniones puente de hidrogeno en forma intra- e inter-molecular permitiendo la cristalización y la formación de microfibrillas de 3 a 5 nm de diámetro. Estas uniones puente de hidrógeno aportan rigidez y dureza a las microfibrillas de celulosa, tan importantes para la función de sostén, defensa y estructura que aporta este compuesto a la pared celular vegetal. Durante la formación de las paredes secundarias, el contenido de celulosa puede incrementarse desde un 20-30% hasta un 50% del peso seco de la pared celular vegetal (Albersheim et al. 2011, Braidwood et al. 2013).

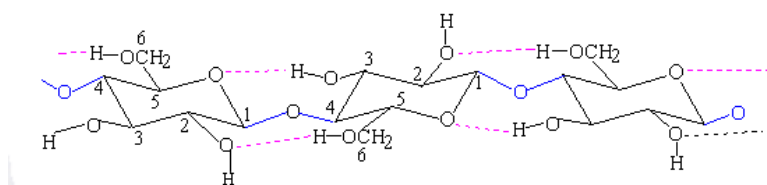


Figura 1: Estructura de una cadena de celulosa

Las hemicelulosas características de las paredes primarias de dicotiledóneas, como *Lotus tenuis* son los xiloglucanos, polímeros formados por cadenas lineales de  $\beta$ -D-glucopiranosas enlazadas por la posición 4, con cadenas laterales de ramificaciones simples

de  $\alpha$ -D-xilopiranososa que se une a la cadena principal por el C-6 de algunas de las unidades de glucosa. A esta estructura básica se unen diferentes cantidades de otros azúcares, como  $\alpha$ -D-galactopiranososa unida a C-2 de algunas de las unidades de xilosa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosa enlazada a C-2 de unidades de glucosa y  $\alpha$ -L-fucopiranososa unida a C-2 de la galactosa. Aproximadamente, constituyen un 30% de las paredes celulares primarias. La estructura fina de estos polímeros, es decir, la distribución de las diferentes cadenas laterales, se puede estudiar por degradación parcial por tratamiento con endoglucanasas y análisis de los oligosacáridos resultantes por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

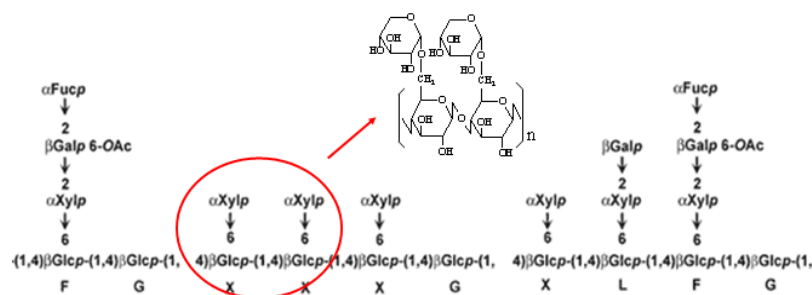


Figura 2: Estructura de un xiloglucano, con detalle de la cadena principal formada por D-glucosa unidas  $\beta$  1-4 con ramificaciones de D-xilosa  $\alpha$ 1-6

Por otra parte, las hemicelulosas predominantes en las paredes secundarias de dicotiledóneas son los glucuronoxilanos y los glucomananos. Los glucuronoxilanos tienen cadenas laterales de ácido 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurónico unido a C-2 de 1 cada 10 unidades de xilosa, en promedio. Este xilano presenta un alto grado de acetilación en C-2 y/o C-3 de las unidades de xilosa. Los glucomananos se encuentran en menor proporción y son polímeros lineales formados por unidades de  $\beta$ -D-manopiranososa y  $\beta$ -D-glucopiranososa en una relación que puede variar de 1:1 a 2:1.

El otro grupo importante de polisacáridos de las paredes celulares lo constituyen las pectinas, un grupo de polisacáridos con alta proporción de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico de

estructuras sumamente complejas. Se distinguen en este grupo el homogalacturonano, que es el estructuralmente más sencillo, formado por unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico enlazadas por C-4. Diferentes proporciones de los grupos carboxilo de los mismos pueden estar dando ésteres metílicos y esta sustitución regula la formación de geles por interacción con iones  $\text{Ca}^{++}$  que da este polímero, contribuyendo a la regulación del tamaño de los poros de la pared celular.

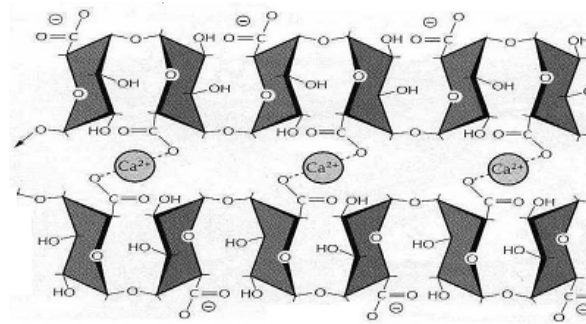


Figura 3: Estructura de pectina. Homogalacturonano

Existen diferentes homogalacturonanos modificados, como los xilogalacturonanos y los ramnogalacturonanos II (los polisacáridos más complejos existentes en la naturaleza). Por otro lado, el ramnogalacturonano I está formado por unidades alternantes de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico enlazadas por C-4 y  $\alpha$ -L-ramnopiranosas enlazadas por C-2. A esta cadena pueden unirse cadenas laterales de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos (Bar-Peled et al. 2012).

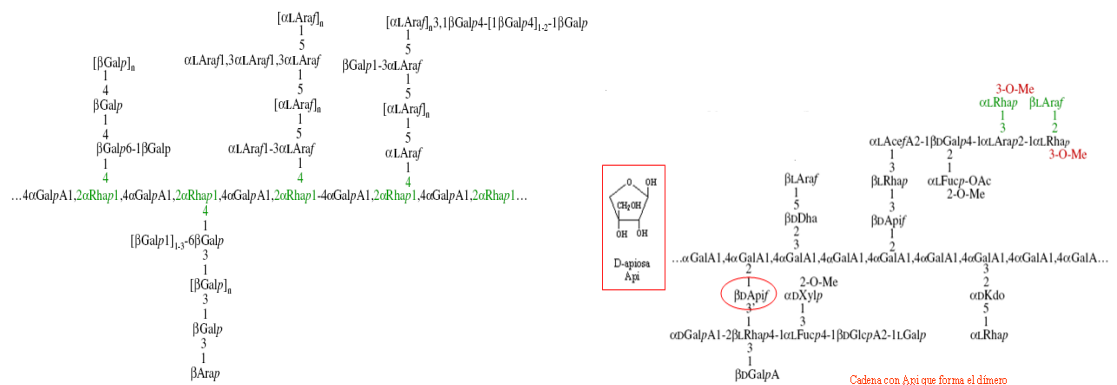


Figura 4: Estructura de una pectina. Ramnogalactouronano I y II



Cuando las células terminan de crecer, adquieren una forma y función definida que se caracteriza por un tipo particular de pared celular. La nueva pared que eventualmente comienza a depositarse entre la pared primaria y la membrana plasmática se define como pared secundaria. Se caracteriza por tener una mayor proporción de celulosa de mayor grado de cristalinidad y contiene además importantes cantidades de lignina.

La lignina es otro de los componentes de la pared celular, es un polímero fenólico y no un hidrato de carbono, que le aporta resistencia mecánica e impermeabilidad a la planta, además constituye una barrera frente al ataque de patógenos. Este polímero aparece fundamentalmente en las paredes secundarias y resulta en una pérdida de la fase acuosa, que es reemplazada por este compuesto hidrofóbico.

Todos los componentes descritos se encuentran en las paredes celulares en diferente proporción y con diferentes interacciones entre sí, dando lugar a una red tridimensional muy compleja y embebida con diferentes proporciones de agua, cuya estructura varía según el tejido y edad de la planta, así como por factores ambientales (Braidwood et al. 2013).

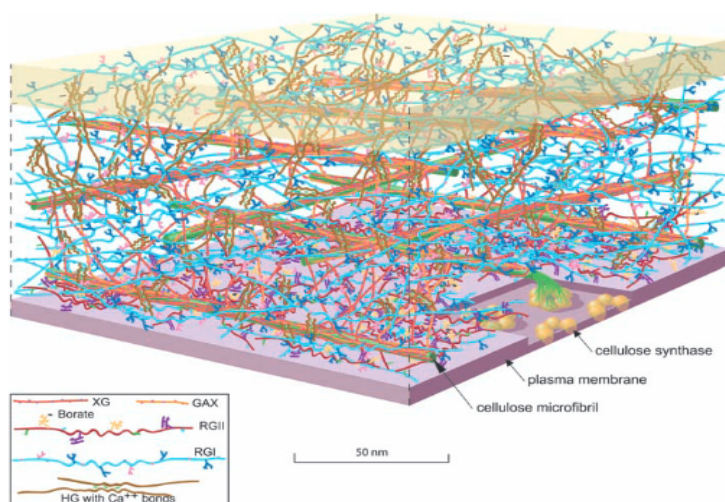


Figura 5: Modelo molecular a escala de la pared celular de una hoja de *Arabidopsis*. La cantidad de cada polímero se basa en su razón respecto del contenido de celulosa. La cantidad de celulosa representada es menor a la real, para mayor claridad del esquema. XG: xiloglucanos, GAX: glucuronoarabinoxilanos, RGII: ramnogalacturonano II, RGI: ramnogalacturonano I, HG: homogalacturonano. Tomado de Somerville et al. 2004.

Las plantas controlan la estructura de sus paredes celulares, tanto alterando los componentes depositados por fuera de la membrana plasmática, como modificando la composición e interacción de los distintos componentes de la pared luego de su deposición. Estas modificaciones en los polisacáridos de pared, producidas luego de su deposición, les permiten a las plantas alterar sus propiedades físicas como respuesta a nuevos estímulos (Braidwood et al. 2013).

## **1.2 Efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular**

En su hábitat natural, las plantas encuentran estreses múltiples que las afectan simultáneamente. Cada estrés, sea de origen abiótico o biótico, activa una serie de respuestas que permiten la adaptación de las plantas a esa condición (Ryan 2000; Tenhaken 2014). Las plantas constantemente modifican sus patrones de crecimiento para ajustarse a los cambios medioambientales (Krauss et al. 2014) basándose en cambios precisos y controlados de la división y expansión celular. Esto es posible debido a la flexibilidad de las paredes celulares primarias que son capaces de expandirse rápidamente manteniendo la presión de turgencia (Somerville et al. 2004; Kesten 2017). El estrés ocurre cuando un agente estresante induce un cambio fisiológico, que produce una reducción en el crecimiento, un cambio en el metabolismo o una combinación de estos factores.

Se define al estrés como la reacción fisiológica del organismo, en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa, para afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada. El concepto de estrés no debe ser aplicado a los rápidos ajustes de flujos metabólicos en respuesta a cambios medio ambientales cotidianos (Roy et al. 2014).

La salinidad en el suelo impone dos tipos de estrés en las plantas, el estrés hiperosmótico, causado por la reducción de potencial agua y que consecuentemente

reduce la disponibilidad de agua para la planta (Munns 1995; Munns 2005), y el estrés hiperiónico, relacionado con la toxicidad producida por la acumulación de iones. El estrés hiperiónico tiene lugar cuando las raíces de las plantas absorben  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Cl}^-$ , y esos iones se acumulan en niveles perjudiciales en las hojas (Greenway 1980; Munns 1993, 2005; Sanchez et al. 2008). Si bien inicialmente los iones reducen el crecimiento de las plantas como consecuencia del estrés osmótico, a medida que transcurre el tiempo, los efectos ión-específicos son importantes en la determinación de tolerancia a la salinidad en el largo plazo (Greenway 1980; Munns 1986; Munns 1995; Foster et al. 2015). Existen también trabajos que reportan menor división celular de células epidérmicas de la raíz y menores rangos de elongación de la raíz, reduciendo el crecimiento de la raíz primaria, pero iniciando el crecimiento de raíces laterales en *Arabidopsis* y trigo (Rahnama et al. 2011; Jung y McCouch 2013; Munns 2015).

Debido a la importancia del estrés salino en la agricultura, existen varios estudios metabolómicos donde se evalúa el efecto metabólico de la salinidad en distintos cultivos, incluyendo tomate, vid, álamos, limonium, arroz, arveja y lotus (Escaray 2007; Zuther 2007; Sanchez et al. 2008, 2010; Shulaev et al. 2008; Bowne 2011; Gimeno 2012; Leonforte et al. 2012).

Frente al estrés salino, el sistema metabólico vegetal debe readaptarse a esta condición de estrés para mantener la homeostasis metabólica, y la producción de compuestos que la ayuden a disminuir la incidencia del estrés sufrido (solutos compatibles, antioxidantes y proteínas relacionadas al estrés). Esto se produce como consecuencia del accionar de distintas hormonas y por modificaciones de la arquitectura de la pared celular (Wolters 2009; Obata 2012).

La homeostasis osmótica se logra compartimentalizando  $\text{Na}^+$  en la vacuola y mediante la biosíntesis y acumulación de solutos compatibles también llamados

"osmoprotectores". Estos osmolitos orgánicos, no tóxicos, elevan la presión osmótica, permitiendo que continúe el ingreso de agua en la planta, y poseen funciones tales como, estabilizar estructuras subcelulares como membranas y proteínas, rescatar radicales libres, actuar como reservorios de carbono y nitrógeno, y regular el potencial redox de la célula. Estos solutos compatibles son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares solubles (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol, y otros metabolitos de bajo peso molecular. (Bohnert 1996; Nuccio 1999; Chen 2000; Pesqueira 2009; Jenck, 2005).

Si bien existen numerosos trabajos respecto a la síntesis y acumulación de estos solutos compatibles, se sabe poco acerca de la regulación y señalización de estos procesos en plantas superiores (Chinnusamy et al. 2005; Pesqueira 2009). Existe una correlación positiva entre plantas halófitas adaptadas a vivir en ambientes salinos y la presencia de polisacáridos sulfatados en la pared celular (Aquino et al. 2011). Este estudio sugiere que la presencia de polisacáridos sulfatados en la pared celular constituye una estrategia de supervivencia de las plantas frente al estrés salino. Las plantas glicófitas no poseen polisacáridos sulfatados, y frente a condiciones de estrés salino no se produce su biosíntesis. Sin embargo, las condiciones de estrés salino en *Oryza sativa* L. indujeron la acumulación de polisacáridos carboxilados (aumento en la proporción de ácidos urónicos) en las paredes celulares (Aquino et al. 2011), que podrían cumplir un rol similar.

La salinidad causa una alcalinización transitoria del apoplasto y esto claramente limita el crecimiento en el contexto de la "teoría ácida del crecimiento celular" (Rayle & Cleland 1970). Esta teoría, formulada hace casi 50 años y luego actualizada recientemente en distintos sistemas celulares vegetales (Arsuffi y Braybrook 2017; Hocq et al. 2017; Geilfuss 2017; Mangano et al. 2018), se sustenta en la hipótesis que las auxinas, como hormonas de crecimiento vegetal, activan a las  $H^+$ (protón)-ATPasas de membrana

plasmática que promueven la salida de protones hacia el apoplasto y a su vez, la acidificación del apoplasto induce la relajación de la pared celular mediante la activación de expansinas y otras enzimas remodeladoras de la pared celular. De esta manera, el crecimiento puede ser limitado por un cambio en el pH apoplástico (Foster y Miklavcic 2015). La extensibilidad de las paredes celulares no es lo mismo que la elasticidad de las paredes celulares, y en algunas circunstancias, según Cosgrove et al. 2016, no estarían correlacionadas. La relajación de la pared celular resultaría en un reordenamiento de los polímeros de la pared, reduciendo consecuentemente la presión de turgencia que permitiría la entrada de agua en la célula, la expansión de la pared celular y la restauración del estrés en la pared.

Por otro lado, las condiciones de estrés biótico, como la herbivoría producida por insectos u otros animales, generan una serie de respuestas a nivel vegetal que dependerán del bioagresor del que se trate. Las respuestas serán de índole constitutiva o inducida. Las respuestas constitutivas o estructurales incluyen barreras físicas como ser ancho de cutícula, composición de la pared celular y presencia de metabolitos secundarios que inhiben la alimentación, tasa de reproducción o el desarrollo de los herbívoros (Walling 2000; War et al. 2012; Steenbergen et al. 2017).

Las respuestas inducidas también varían de acuerdo al bioagresor de que se trate y dependen de mecanismos de activación directos e indirectos que incluyen la síntesis hormonal y la síntesis de metabolitos secundarios. Las defensas químicas producidas pueden ser entre otras: alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos y compuestos acetilénicos. Estos compuestos químicos inducidos pueden actuar interfiriendo en el metabolismo animal, o bien aumentando la resistencia de las plantas frente a herbívoros, afectando la atracción o aversión al consumo y también en la atracción de enemigos naturales del herbívoro (Van Soest 1994; Zavala et al. 2006; Zavala et al. 2008; Dicke,

2015; Steenbergen et al. 2017; Dillon et al. 2018). Si bien es poco lo que se sabe, está bien documentado actualmente que la herbivoría produce cambios sistémicos en la biosíntesis y degradación de los diferentes biopolímeros que constituyen las paredes celulares (Giordanengo et al. 2010). Existen estudios que relacionan la composición de carbohidratos (pectina) de la pared celular vegetal con la deposición de calosa en la pared, como factores importantes en la susceptibilidad de las plantas al ataque fúngico (Dreyer 1987; Vorwerk et al. 2004). La relación pectinas-calosa, también puede tener importancia en la interacción planta-insecto (Dreyer 1987; Botha 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta respecto a la repuesta de las plantas frente a un estrés es el de la utilización de la energía. Las plantas mediante la fotosíntesis obtienen una cantidad finita de energía que usarán para todos los procesos que incluyen el mantenimiento de su biomasa, la síntesis de lípidos, carbohidratos, *turn over* proteico, mantenimiento de los gradientes iónicos y obtención de nutrientes, también para su crecimiento y dependiendo del estado fenológico de la planta para la reproducción o llenado de granos. Frente a un estrés, las plantas verán afectado el total de la energía disponible debido a menores tasas fotosintéticas en algunos casos o por mayores costos energéticos de adecuación y/o respuesta a ese estrés. Si los estreses sufridos afectan la utilización de energía y generan un efecto sobre la síntesis de compuestos no solo a nivel del crecimiento y desarrollo del vegetal sino a nivel estructural de las paredes celulares, se podría ver afectado su aprovechamiento en el caso de especies forrajeras, ya que las paredes celulares constituyen la base energética de la dieta de los rumiantes en pastoreo. Frente a un estrés severo, no habrá crecimiento, ya que el balance energético será neutro o negativo y cuando los costos energéticos sean mayores comenzará a producirse senescencia de tejidos dependiendo del tipo de estrés (Munns 2015).

### 1.3 Contextualización geográfica: Depresión del Salado

En la Argentina, en la provincia de Buenos Aires, existe una zona de marcada importancia para la cría de ganado bovino sobre pastizales naturales, conocida como Pampa inundable o Deprimida o la zona de la Cuenca del Salado, que abarca aproximadamente 10,5 millones de hectáreas (Burkart et al., 2005). Estas tierras se caracterizan por presentar suelos bajos, salinos y/o alcalinos (Burkart et al. 1990; Casal et al. 2009; Castaño 2001; Criado 2014; Vignolio y Fernandez 2006). Los suelos más comunes de la zona son los Natracuoles. Típicamente presentan un horizonte arcilloso de baja permeabilidad. Al ser una llanura mayormente plana o con pendiente muy reducida ( $< 0,1\%$ ), el drenaje del agua es lento por lo cual los excesos de lluvia otoñales e invernales y los déficits estivales determinan que sea frecuente la alternancia de anegamiento y sequía (Batista et al. 2005).

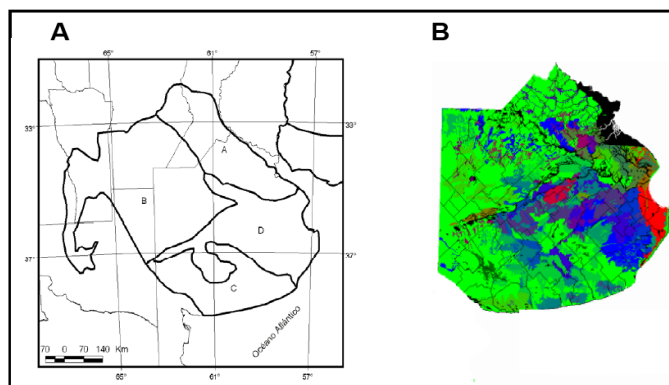


Figura 6: Región pampeana argentina. A: esquema de las subregiones de la región pampeana argentina. (A): Pampa Ondulada; (B): Pampa Interior; (C): Pampa Austral y (D): Pampa Deprimida. B: imagen que muestra en diferentes colores, las comunidades potenciales de pastizales distribuidas según las características geomorfológicas. En azul, las zonas inundables de praderas húmedas de mesófitas y de hidrófilas, en rojo, estepas de halófitas y en verde, praderas de mesófitas. (Adaptado de Burkart et al., 2005) (Antonelli 2017).

A diferencia de los animales monogástricos, los rumiantes poseen la habilidad de alimentarse y satisfacer sus requerimientos de mantenimiento y producción en base al consumo de plantas (forrajes) como única fuente de nutrientes ya que pueden degradar

tanto el contenido celular como los polisacáridos de las paredes celulares vegetales por medio de los microorganismos que alojan en el rumen.

Los forrajes contienen en su materia seca, 20-30% de celulosa, 14-20% de hemicelulosa, hasta un 10% de pectinas, además de un 2 a 12% de lignina (Bondi 1989). La mayor parte de los hidratos de carbono solubles (azúcares, almidón y pectinas) y menos solubles (celulosa y hemicelulosa) son fermentados por los rumiantes hasta ácidos grasos volátiles al pasar los alimentos por el rumen debido a la acción de las enzimas microbianas. Estos ácidos grasos volátiles son absorbidos por las paredes del rumen y pasan a circulación sanguínea para luego ser utilizados para obtención de energía o síntesis de productos (grasa, proteína, etc).

Los polisacáridos de las paredes celulares vegetales aportan a los animales en pastoreo entre el 30 y el 40% de la energía digestible consumida (Ramirez Orduña et al. 2002; Mc Donald 2006). La cantidad, composición y estructura de las paredes celulares afectará el consumo de los animales rumiantes en pastoreo y la digestibilidad total del material consumido (Ramirez Orduña et al. 2002; Van Soest 1998; Mc Donald 2006). El material vegetal que presente mayor proporción de contenido celular (hidratos de carbono solubles) y menor proporción de pared celular tendrá una digestibilidad mayor respecto a aquel en el que se presente la relación inversa. La energía disponible aumentará al disminuir el contenido de pared celular. A su vez la composición de la pared celular y la interacción entre sus componentes incide también en la digestibilidad, siendo las pectinas las más digestibles, luego las hemicelulosas, después la celulosa. La lignina y su relación con el resto de los componentes de la pared inhiben la digestibilidad de la pared celular (Jung y Vogel 1986).

Dentro de las plantas, las leguminosas o fabáceas pertenecen a la segunda familia en importancia después de las gramíneas o poáceas. Ellas proveen el mayor aporte



proteico vegetal en las dietas, tanto para el hombre, como para los animales en pastoreo (Graham & Vance 2003; Dita et al. 2006).

Existe una leguminosa naturalizada en la zona de la Cuenca del Salado, que por sus características y adaptación a los bajos tendidos se destaca: *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*). Se encuentra distribuida en el mundo en amplias zonas, siendo originaria de Europa y Asia Menor. (De Battista, 2005).

#### **1.4 *Lotus tenuis* como modelo para el estudio del efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular.**

*Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) se destaca en la zona de la Cuenca del Salado debido a su tolerancia al estrés salino, a los terrenos inundados y a los suelos alcalinos (Escaray et al. 2012; García et al. 1994; Mendoza et al. 2005; Vignolio et al. 2006; Teakle et al. 2006; Pesqueira et al. 2007; Teakle et al. 2010a; Escaray et al. 2012). *L. tenuis* es una leguminosa herbácea perenne, vulgarmente conocida como lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta. Su ciclo de producción forrajera es primavero-estivo-otoñal, presentando latencia invernal intermedia. Presenta alta variabilidad genética (Andrés y Rosso 2007; Stoffella et al. 1998; Kade et al. 2003), y alta plasticidad fenotípica, esto le permite crecer y desarrollarse en distintas condiciones ambientales (Goldberg 2010). Presenta crecimiento de tipo postrado, pero adquiere porte erecto en condiciones de competencia por luz. (Montes 1988; García et al. 1994; Vignolio et al. 2006).

Esta especie puede establecer asociaciones simbióticas con rizobios y micorrizas. Debido a esto, puede verse favorecida por la fijación de nitrógeno y en su utilización y también por un aumento en la capacidad de absorción de minerales aún bajo condiciones de inundación o de sequía (Mendoza 2005; Escaray 2007, Escaray et al. 2012). Sintetiza

taninos condensados que participan en la defensa contra bacterias, hongos e insectos (Vignolio y Fernandez 2006).

*Lotus tenuis* presenta un tallo principal que, a partir del primer año, forma una corona con numerosa cantidad de yemas. Las hojas son sésiles, compuestas, imparimpinadas, con cinco folíolos, de los cuales el par inferior o basal se encuentra distanciado de los restantes (Carrillo 2003). La corona se continúa en una raíz pivotante que ramifica en raíces adventicias. La floración comienza en primavera y termina hacia fines del verano. Las flores son de color amarillo, pedicelo corto y están dispuestas en umbelas (1 a 6) (Criado 2014; Vignolio y Fernandez 2006). Su crecimiento es indeterminado, durante la etapa reproductiva pueden encontrarse ejes con primordios florales, umbelas de flores o umbelas de vainas en diferentes estados de maduración y dehiscencia (Cambareri et al. 2007; Criado 2014; Escaray 2012; Vignolio y Fernandez 2006; Miñón et al. 1990).

Se desarrolla en ambientes templados aunque tolera temperaturas inferiores a 0°C, y el congelamiento del agua en condiciones de anegamiento, presentando una mejor adaptación a estas condiciones en comparación con otras leguminosas forrajeras, como *Lotus corniculatus*, *Trifolium sp.* y *Medicago sp.* a bajas y altas temperaturas (Vignolio y Fernandez 2006; Escaray 2012). Presenta una digestibilidad promedio de 75% en todo el ciclo vegetativo, con una caída menos acentuada a la madurez en comparación con otras fabáceas, como *Lotus corniculatus* y *Medicago sativa*, con menor contenido de lignina (Criado 2014; Miñón et al. 1990). El contenido de proteína bruta varía entre 20 y 22 % de la MS. Puede diferirse para uso invernal y muestra gran calidad nutricional y productividad (Andrés & Rosso 2007; Criado 2014; Vignolio y Fernandez 2006).

Son pocas las especies de relevancia agrícola capaces de crecer bajo condiciones que combinan inundación y salinidad (Barret-Lennard 2003; Rengasamy 2003; Escaray

2007). Se ha demostrado la existencia de poblaciones de *L. tenuis* con diferentes grados de tolerancia a distintos niveles de inundación y salinidad (Vignolio, 1994; Escaray 2007; Teakle 2010; Striker et al. 2012; Manzur 2005).

Todavía es muy poco lo que se sabe respecto a las modificaciones de la pared celular bajo diferentes estreses abióticos a nivel molecular, celular, de tejido y de toda la planta. En los trabajos relevados hasta el momento acerca de *Lotus*, se encontró que durante el estrés salino se producen cambios morfológicos y anatómicos entre las plantas control y las plantas que fueron expuestas a salinidad. Estos cambios se vieron reflejados en reducción de la biomasa y número de tallos, disminución del diámetro promedio del tallo principal y ramificaciones por planta. Respecto a las hojas, se encontró menor número y tamaño de hojas, engrosamiento de folíolos y reducción del tamaño celular. A su vez, el número de tallos y ramificaciones por planta correlacionó significativamente con el peso fresco aéreo. Poblaciones con alta producción de materia seca fueron las que mayor disminución de peso presentaron al exponerlas a salinidad (Sanchez-Blanco et al. 1998; Sanchez et al. 2008; Pesqueira 2009; Franco 2012; Dolatabadian 2011).

Por otra parte, en otras especies se encontraron cambios debidos al estrés en la anatomía del tejido radical. En raíces de plantas de arveja estresadas con soluciones de NaCl se observó que las células eran más grandes y que las paredes celulares resultaron más gruesas (Pesqueira 2009).

Frente al estrés salino se encontraron también, cambios metabólicos globales, que incluyen un aumento en los niveles de aminoácidos específicos, azúcares y polioles, que han sido previamente identificados como metabolitos que se acumulan en condiciones de estrés salino. A estos compuestos usualmente se los conoce como solutos compatibles (Sanchez et al. 2008). En los trabajos relevados además, las condiciones de estrés salino aumentan la concentración de los aminoácidos, prolina, serina, treonina, glicina y

fenilalanina, así como también, la concentración de los hidratos de carbono, sacarosa, fructosa y mioinositol. Sin embargo, este tipo de estrés disminuye la concentración de ácidos orgánicos en los tejidos vegetales, entre los que se destacan los ácidos cítrico, succínico, fumárico, eritrónico y glicólico (Sanchez et al. 2008).

Estudios recientes sugieren que las condiciones de estrés, tanto biótico, como abiótico podrían modificar la composición química de la pared celular (Hématy et al. 2009; Fangel et al. 2012; Le Gall et al. 2015). Se ha determinado que las proteínas expansinas, involucradas en el crecimiento de las paredes celulares, cumplen una función importante (Choi et al. 2003; Cosgrove 2005) en la aclimatación y respuesta de la planta a condiciones de estrés abiótico. Estos estudios se han realizado sobre plantas halófitas como el arroz, o glicófitas como *Arabidopsis*, tomate y *Lotus* (Munns 2005; Pesqueira 2009; Sanchez et al. 2011), pero hasta el momento no existen estudios sobre los efectos del estrés salino sobre la pared celular de *Lotus tenuis*.

Las condiciones de estrés biótico también pueden producir cambios en las paredes celulares de las plantas por medio de fitohormonas relacionadas con las defensas contra herbívoros. El aumento de la producción de defensas químicas está regulado por fitohormonas, como ácido salicílico y ácido jasmónico (JA), que modulan una serie de respuestas. Al JA se lo asocia generalmente con las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos, incluyendo déficits hídricos y herbivoría (Zavala et al. 2008; Balbi 2008; Sánchez-Rodríguez et al. 2010; Schmelz et al. 2003; Ismail et al. 2012). El daño foliar incrementa la acumulación de esta hormona vegetal en las células de las plantas, disminuyendo su crecimiento y aumentando la acumulación de metabolitos secundarios de defensa (Ellis et al. 2002; Rogers 2004; Howe 2008; Browse 2009). La aplicación exógena de JA como jasmonato de metilo, ha demostrado su efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas, y positivo sobre la biosíntesis de celulosa, y a su vez,

incrementa la producción de compuestos fenólicos y antinutritivos que detienen o disminuyen el ataque de los herbívoros (Howe 2008; Zavala 2004, Wasternack 2007). En la información relevada hasta el momento son nulos los aportes encontrados sobre los efectos del estrés biótico en la composición de la pared celular del *Lotus tenuis*.

Las condiciones de estrés biótico o abiótico producirían cambios químicos en la pared celular de *L. tenuis* que podrían afectar la digestibilidad de esta especie. El aprovechamiento potencial de esta especie forrajera dependerá esencialmente de su composición química, como de la disponibilidad de los componentes de la pared celular y del contenido celular, así como de la presencia de estructuras orgánicas e inhibidores digestivos, que impidan o limiten la disponibilidad de los componentes de la pared y del contenido celular con los que se encuentran asociados (Van Soest 1994; Escaray 2007). La dureza de la pared celular no solo proporciona resistencia mecánica al ataque de microorganismos e insectos, sino que limita la digestibilidad de hojas y tallos. Aunque la proporción de lignina se correlaciona negativamente con la digestibilidad, esta correlación puede no ser directa, ya que es muy importante su distribución e interacción de los componentes de la pared, ya que determinan la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas.

El mantenimiento y la producción de los rumiantes en pastoreo depende de la calidad y cantidad del alimento consumido y del grado de aprovechamiento del mismo. La evaluación del valor nutricional de los forrajes utilizados en pastoreo puede realizarse por métodos que evalúan la composición química en el laboratorio (método de Weende y de Van Soest), por métodos que evalúan la digestión de los mismos con utilización de microorganismos o enzimas, ya sea *in vivo*, *in situ* e *in vitro* u otros como la metodología NIRS (por reflectancia en el infrarojo cercano) mediante ecuaciones basadas en parámetros químicos y de digestión (Van Soest 1994). Las evaluaciones *in vivo* e *in situ*

son la referencia para las estimaciones de digestibilidad y concentración energética. Sin embargo, el uso de animales para la evaluación de los alimentos posee desventajas, como ser elevados costos, requerimientos de mano de obra, cantidad de alimento, infraestructura y tiempo hasta la obtención del resultado (Wawrzukiewicz 2010). Dentro de las técnicas *in vitro*, la de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (1963), que fue modificada por Goering y Van Soest (1970) (Van Soest 1994) y se utiliza para estimar la digestibilidad final del sustrato, sin proveer información sobre la cinética de digestión. Otro método *in vitro* que se utiliza es la técnica de producción de gases, que permite determinar la extensión y la cinética de la degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou et al. 1994). Una de las ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato pueden ser cuantificados (Doane et al. 2014), permitiendo también el estudio de las fases tempranas de la fermentación, mientras que los procedimientos gravimétricos (Jung 1997, Van Soest 1994) no son lo suficientemente sensibles para medir los pequeños cambios que ocurren en el peso del sustrato durante las primeras horas de fermentación. La técnica de producción de gas puede ser también usada para determinar la importancia de las diferentes fracciones alimenticias (monosacáridos, pectinas, almidón, celulosa y hemicelulosas) para proveer energía a los microorganismos (Posada et al 2005).

De todas las metodologías mencionadas la más comúnmente utilizada por los productores y asesores nutricionistas para el armado de las rotaciones y de dietas en los establecimientos ganaderos es el sistema de detergentes de Van Soest (Van Soest 1994; Mc Donald 2002). Este procedimiento se realiza en un laboratorio y es un método relativamente rápido y sencillo utilizado para determinar la matriz insoluble de la pared celular y estimar sus componentes. Implica un fraccionamiento utilizando detergentes.

Primero las muestras son tratadas con una solución detergente neutra basada en sulfato láurico de sodio y ácido etilendiamino tetracético, solubilizando así el contenido celular compuesto por almidón, azúcares, ácidos orgánicos, proteínas solubles, lípidos y nitrógeno no proteico también las pectinas que corresponden a la pared celular pero que al igual que el resto de las sustancias extraídas son rápidamente aprovechadas por los microorganismos ruminales.

Se obtiene así un residuo denominado fibra detergente neutro (FDN) compuesto por los materiales mas insolubles de la pared celular. Este residuo luego es tratado con una solución detergente ácida de ácido sulfúrico y bromuro de cetiltrimetilamonio que solubiliza a las hemicelulosas obteniendo un residuo de celulosa, lignina, proteína insoluble y algunos minerales (sílice) denominado fibra detergente ácido (FDA). Se puede seguir fraccionando este residuo con una extracción posterior con ácido sulfúrico concentrado que solubiliza a la celulosa dejando un residuo de lignina (LFDA). Como se destacó anteriormente existe una correlación negativa entre la proporción de la pared celular de las forrajeras y el consumo voluntario de los rumiantes, y del mismo modo existe una correlación negativa entre el porcentaje de FDA y la digestibilidad, o sea la cantidad del alimento que será aprovechado dentro del tracto digestivo del animal.

Varias publicaciones muestran resultados experimentales sobre la respuesta de distintas especies forrajeras frente al estrés salino. Estos muestran que el estrés salino no solo disminuye significativamente el crecimiento y la biomasa de las plantas, sino que también produce reducción o alteraciones en el contenido de FDN y FDA (Ben-Ghedalia et al. 2001; Kumar et al. 2018). En estos trabajos se observa que existen diferencias a nivel de pared celular, pero no es posible asociar a qué componente de la pared celular se deben estas diferencias que podrían ser de importancia para la degradación que sufrirá esa especie a nivel ruminal al ser pastoreada. Teniendo esto en consideración y buscando

lograr una caracterización química más completa para evaluar el efecto del estrés salino y biótico sobre una especie forrajera de importancia en nuestro país, en este trabajo, para determinar los efectos de las condiciones de estrés abiótico salino y estrés biótico sobre las paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis* se utilizaron distintos métodos de análisis químicos de laboratorio evaluando su complementariedad y diferencias. Los tradicionalmente utilizados para la toma de decisiones a nivel producción (FDN, FDA y LigFDA), la técnica de producción de gases, que permite determinar la extensión y la cinética de la degradación del alimento y métodos más específicos de laboratorio para la caracterización de los componentes de la pared celular por espectrofotometría y cromatografía gaseosa.

### **1.5 Objetivos e hipótesis de trabajo.**

#### **1.5.1 Objetivo general:**

Estudiar el efecto del estrés abiótico salino y biótico sobre la composición y morfología de la pared celular en las hojas y los tallos de *Lotus tenuis*. Para ello se observarán complementariedad y diferencias entre las metodologías de análisis más comúnmente utilizadas en el contexto agropecuario: la técnica de FDN y FDA con el apoyo de la técnica de producción de gas y métodos más específicos de laboratorio (espectrofotometría y cromatografía gaseosa). De este modo se busca lograr una caracterización química más completa de los componentes de la pared celular para evaluar el efecto del estrés salino y biótico sobre esta especie forrajera de importancia en nuestro país.

#### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar la composición química y estructural de las paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis* en estado vegetativo.



2. Determinar la variación de las características químicas de las paredes celulares de hojas y tallos de líneas de *L. tenuis* tolerantes o susceptibles a ambientes salinos en estado vegetativo cultivadas con diferentes niveles de cloruro de sodio en el suelo.
3. Determinar el efecto de insectos herbívoros sobre la composición química de la pared celular foliar de *L. tenuis*.
4. Determinar el contenido de las fitohormonas de defensa ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS), ácido jasmónico-isoleucina, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido indol acético y ácido abscísico frente a las condiciones de estrés biótico y abiótico salino.
5. Determinar las consecuencias de las condiciones de estrés biótico o abiótico sobre la digestibilidad *in vitro* de hojas y de tallos de los dos genotipos a estudiar de *L. tenuis*.
6. Observar la complementariedad y diferencias entre las metodologías de FDN, FDA, la técnica de producción de gas y los métodos más específicos de laboratorio para la caracterización de los componentes de la pared celular por espectrofotometría y cromatografía gaseosa.

### **1.5.3 Hipótesis de trabajo:**

H1) El estrés salino produce cambios en la composición química de la pared celular de tallos y hojas en estado vegetativo de *L. tenuis*, y este efecto es diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles al estrés salino.

- a. La modificación en las paredes celulares de *L. tenuis* y en la estructura de los polisacáridos que las constituyen son unos de los mecanismos importantes en la aclimatación de estas plantas terrestres a los ambientes de alto grado de salinidad. Esta modificación no sólo implica un cambio en el grosor de las paredes y el tamaño

de las células, sino que además podría tener consecuencias en la composición en los polisacáridos de la pared y su estructura fina.

b. La diferencia en el comportamiento de las variedades resistente y susceptible al estrés salino en *L. tenuis* podría relacionarse, en parte, con diferencias en las paredes celulares de las mismas.

c. Genotipos de *L. tenuis* tolerantes a salinidad en estado vegetativo podrían presentar alteraciones en la composición química de la pared celular que podría evidenciarse por una mayor concentración de polisacáridos ácidos, especialmente en el contenido de pectinas.

H2) La herbivoría de insectos induce cambios morfológicos y químicos en las paredes celulares de las células de las hojas atacadas.

a. La herbivoría por insectos induce cambios en la cutícula de las hojas, en las células afectadas e induce cambios estructurales en las células adyacentes que podrían evidenciarse por un engrosamiento de las paredes celulares.

H3) Los cambios morfológicos y químicos de las paredes celulares de *L. tenuis* debido al estrés salino o herbivoría afectan la calidad nutricional de los tallos y las hojas de las plantas en estado vegetativo, afectando su digestibilidad potencial.

a. Además del descenso en la biomasa total como consecuencia de la adaptación al estrés salino, el engrosamiento en las paredes celulares y otros cambios a nivel molecular podrían producir una diferencia en la digestibilidad potencial de *L. tenuis*.

b. Una disminución en el contenido de pectinas en los genotipos de *L. tenuis* susceptibles afectaría negativamente la digestibilidad de los tallos y de las hojas. Un aumento en la concentración de celulosa y de lignina como consecuencia de la adaptación al estrés salino reduciría la digestibilidad de la pared, por la menor

- digestibilidad intrínseca de esos compuestos y por su efecto barrera al aprovechamiento potencial del contenido celular.
- c. La herbivoría producida por insectos afectaría negativamente la digestibilidad de las hojas de *L. tenuis* por un aumento en la concentración de celulosa y lignina y una disminución en el contenido de pectinas.
  - d. El JA y el SA, el ácido jasmónico-isoleucina, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido indol acético y ácido abscísico podrían tener una función moduladora en los cambios químicos de la pared producidos por estrés biótico (herbivoría) y por estrés abiótico salino. Un aumento en la concentración de las fitohormonas JA y SA podría regular los cambios químicos de la pared.
  - e. La complementariedad de los análisis efectuados permitiría explicar con mayor exactitud los cambios encontrados a nivel de pared celular debido al estrés salino y al estrés biótico.

## **2. Capítulo 2 Materiales y métodos**

### **2.1. Material utilizado**

En los experimentos se utilizaron semillas de la especie *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) pertenecientes a dos familias de medios hermanos (FMH) caracterizadas por su distinta susceptibilidad frente al estrés salino: una, caracterizada como tolerante (FMH 490), y la otra, como susceptible (FMH 2241) a la salinidad (Franco 2012). Éstas fueron obtenidas gracias a diversos experimentos dentro del Programa de Selección Recurrente Fenotípica y fueron cedidas gentilmente por la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino del INTA. Las mismas provienen de poblaciones naturalizadas y fueron recolectadas en campos bajos de la Provincia de Buenos Aires (rango de latitud de 33°47' a 37°39' y de longitud de 59°02' a 60°52') y se caracterizaron morfo-fisiológica y productivamente (Andrés et al. 2007; Franco 2012).

### 2.2.1 Germinación, bandejas y transplante en macetas

Los experimentos para evaluar tanto el estrés salino, como el estrés biótico se llevaron adelante inicialmente en el laboratorio y luego bajo invernáculo. Primero, se realizó el escarificado mecánico de las semillas con lija al agua P400 (3M). Una vez escarificadas, las semillas fueron colocadas en cajas de Petri a razón de 15-20 semillas por caja con dos hojas de papel de filtro humedecido con agua destilada. Estas cajas fueron colocadas de a cinco, en bolsas tipo “ziploc” dentro de una cámara de germinación a 25°C de temperatura constante y 24 hs de luz (200lmolm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) suministrada con lámparas Gro-lux fluorescentes (F 40 W).

Diariamente se registró el número de semillas germinadas. Las plántulas logradas se colocaron en bandejas de germinación con un sustrato de compost orgánico y perlita con suministro de 24 hs de luz artificial (400 watts) y riego diario por aspersión manual con agua corriente. Cuando las raíces fueron visibles bajo las bandejas, éstas se llevaron al invernáculo, y dos días después se transplantaron las plántulas a macetas de 20 cm de diámetro y 2.56 l de capacidad, previamente preparadas con un sustrato de compost orgánico (Bertinat) y perlita (4:1). Se colocaron 5 plántulas por maceta y se dispusieron 5 macetas en cada bandeja.



Figura 7 a-b-c: a) Caja de Petri con las semillas b) Bandejas de germinación c) Vista de las plantas colocadas en las macetas y en las bandejas.

En el primer experimento, para evaluar los efectos del estrés salino se trabajó con 1100 plantas, 550 plantas de la variedad tolerante y 550 plantas de la susceptible. A su vez, se dividieron en tres grupos: 1. Un grupo testigo control, sin aplicación de NaCl en

el riego. 2. Un grupo llamado “dosis 1” que fue regado con una solución 75 mM NaCl. 3. Un grupo llamado “dosis 2” que fue regado con una solución 150 mM NaCl.

### **2.2.2 Tratamientos realizados**

#### **Ejemplares Tolerantes (FMH 490):**

Testigo (TT) 20 macetas (cinco plantas cada una) en cuatro bandejas (4 repeticiones)

Dosis 1 (D1T) (75 mM NaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas (9 repeticiones)

Dosis 2 (D2T) (150mMNaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas (9 repeticiones)

#### **Ejemplares Susceptibles (FMH 2241):**

Testigo (TS) 20 macetas (cinco plantas cada una) en cuatro bandejas (4 repeticiones)

Dosis 1 (D1S) (75 mM NaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas (9 repeticiones)

Dosis 2 (D2S) (150mMNaCl): 45 macetas (cinco plantas cada una) en nueve bandejas (9 repeticiones)

Las plantas fueron regadas con agua corriente hasta el estado de cuarta hoja pentafoiliada desplegada para garantizar un mejor desarrollo de las plantas. Cuando las plantas alcanzaron el estado de cuarta hoja pentafoiliada desplegada, se las regó con la mitad de la dosis durante una semana y después se aplicaron en forma completa los distintos tratamientos, en función del agua de riego utilizada. El tratamiento salino se aplicó durante 62 días. También, se prepararon de la misma manera dos macetas como testigo para las mediciones de conductividad y actividad del suelo.

La cosecha de las plantas se realizó al evidenciar la aparición de la primera flor, separando cuidadosamente cada una de las plantas de la tierra y la perlita.

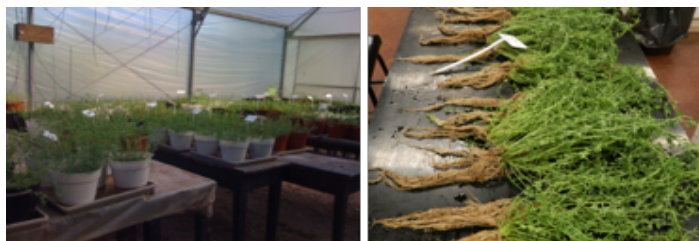


Figura 8 a y b: a) Vista de las plantas en el invernáculo b) Vista de las plantas cosechadas en el laboratorio antes de realizar las mediciones.

Para cada ejemplar, se separaron y pesaron biomasa de tallo y hojas y biomasa de raíz, se determinó número de ramificaciones, largo de tallos y largo de raíz. Se tomaron muestras de folíolos, de tallos y de raíz para los preparados de microscopía y para las determinaciones de hormonas (este material previo a su liofilizado se mantuvo en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Luego, se determinó el porcentaje de materia seca de tallos y hojas y de raíz por secado a  $65^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante en estufa a aire forzado.

Las variables en estudio respecto a crecimiento fueron:

- peso (en gramos) de la biomasa de los tallos y las hojas
- % de materia seca (MS) de los tallos y las hojas
- % de la biomasa de los tallos y las hojas
- peso (en gramos) de la biomasa de las raíces
- % de MS de las raíces
- % de la biomasa de las raíces
- Peso de la MS de tallos por planta
- Peso de la MS de las hojas por planta
- Largo de las raíces
- Largo de los tallos

-Número de ramificaciones

Este experimento, llevado adelante en el año 2012, fue realizado nuevamente en el año 2013 con un número menor de plantas para observar si el comportamiento de las dos familias de medios hermanos era similar para las mismas variables estudiadas. El escarificado, germinación, embandejado de plántulas y pasaje a macetas definitivas se hizo del mismo modo que en el experimento anterior.

Cuando las plantas alcanzaron el estado de cuarta hoja pentafoliada desplegada, al igual que en el experimento del año 2012, se comenzaron a aplicar los distintos tratamientos, en función del agua de riego utilizada.

En el segundo experimento, las plantas se distribuyeron del siguiente modo:

**Familia Tolerante (FMH 490):**

- Testigo (agua común) (TT): 4 macetas con cinco plantas cada una (20 plantas)
- Dosis 1 (solución de 75 mM NaCl) (D1T): 4 macetas con cinco plantas cada una (20 plantas)
- Dosis 2 (solución de 150 mM NaCl) (D2T): 5 macetas con cinco plantas cada una (25 plantas)

**Familia Susceptible (FMH 2241):**

- Testigo (agua común) (TS): 3 macetas con cinco plantas cada una (15 plantas)
- Dosis 1 (solución de 75 mM NaCl) (D1S): 3 macetas con cinco plantas cada una (15 plantas)
- Dosis 2 (solución de 150 mM NaCl) (D2S): 3 macetas con cinco plantas cada una (15 plantas)

La cosecha de las plantas se hizo cuando comenzaron a aparecer las flores. Los parámetros evaluados fueron los mismos que en el experimento anterior.

Para el análisis de los dos experimentos (2012 y 2013) se utilizó un diseño experimental con una distribución completamente aleatorizada de tipo factorial, siendo los factores el genotipo (con dos niveles: tolerante y susceptible) y la dosis de cloruro de sodio en el agua de riego (con tres niveles: 0 mM, 75 mM y 150 mM NaCl).

El experimento realizado para la evaluación de los efectos del estrés biótico se llevó adelante desde el mes de agosto hasta el mes de diciembre de 2016. Se decidió trabajar con la FMH 490 que presentaba mayor biomasa. La obtención de plántulas se hizo como se describe en 2.2.1.

Se colocaron 5 plántulas por cada maceta y se dispusieron 5 macetas por cada bandeja. Se trabajó con 20 macetas con 5 plantas cada una. Las 100 plantas obtenidas fueron cubiertas cada una con una malla fina de tul (carpas) para evitar el ataque de insectos. Durante el año 2015 se había realizado un experimento en forma similar y debido al ataque de diversos insectos se decidió levantar el experimento, ya que no estaban dadas las condiciones necesarias para realizar en forma correcta las determinaciones deseadas.

El riego de las plantas obtenidas se hizo con agua corriente día por medio, manteniendo la capacidad de campo. En el mes de noviembre, cuando las plantas presentaban un buen desarrollo y antes que comenzara la floración, se las dividió en dos grupos, unas serían las plantas testigo y otras las plantas atacadas. Se las cubrió en forma independiente con una malla fina de tul. Para evaluar el impacto del estrés biótico sobre las paredes celulares de *Lotus tenuis* se utilizaron Thrips, *Caliothrips phaseoli*. A las plantas identificadas como atacadas, se le fueron colocando trips, a razón de 25 trips durante 4 días. A la semana siguiente volvió a agregarse 30 trips más, ya que no se evidenciaba un ataque muy significativo. Los trips fueron colectados del invernáculo con un dispositivo (ver Figura 26 C) y luego se fueron soltando sobre las plantas “atacadas”.



Cuando aparecieron las primeras flores, se levantó el experimento. Las plantas se llevaron al laboratorio. Se separó la biomasa aérea y se determinó su peso. Se separaron muestras de hojas de las plantas atacadas y las plantas testigo para las determinaciones de hormonas y para los cortes de microscopía, del mismo modo que para los experimentos anteriores (Ver 2.2.4). Se determinó porcentaje de materia seca, de los tallos y las hojas por secado a 65°C en estufa a aire forzado, hasta que no se detectó variación en el peso. Se separaron tallos y hojas. Sobre el material seco y molido de las hojas se midieron variables nutricionales y se extrajeron los polisacáridos de pared.

Los resultados obtenidos de todos los experimentos fueron evaluados a través de un análisis de la varianza utilizando el software estadístico Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) tomando como nivel de significación un 5%. Para hacer los distintos análisis estadísticos, se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad para cada variable, tanto en forma analítica, como gráfica. Las comparaciones entre genotipos y entre tratamientos se efectuaron utilizando la prueba de las diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher.

Para evaluar la performance de cada genotipo frente al estrés salino, se calculó expresando en términos de porcentaje, la respuesta de cada uno en las dosis salinas frente a los tratamientos testigos.

### **2.2.3 Medición de variables del ambiente**

Durante los experimentos se tomaron datos de temperatura externa e interna del invernáculo con un datalogger de 12 canales (Cavadevices, Capital Federal, Argentina). También, se obtuvieron referencias de la radiación solar incidente, tanto fuera, como dentro del invernáculo, con un radiómetro (Ceptometro LP-80, Decagon Devices, Pullman, Washington, Estados Unidos). Para los experimentos de estrés salino, la actividad eléctrica de la tierra (AS) de las macetas se evaluó con un conductímetro

(Modelo HI 993310, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos). Este valor de AS suministrado por el equipo se utilizó para calcular la conductividad eléctrica (CE) de la tierra. Se multiplicó el dato de AS por 2,3 para obtener la salinidad en g/l y dividiendo el resultado por 0,64, ya que la CE a 25°C tiene una relación con la salinidad, de 1mS/cm por cada 0,64 g de sal.

#### **2.2.4 Estudios anatómicos estructurales. Observaciones con microscopía óptica (MO):**

Para realizar un estudio anatómico preliminar con microscopía óptica, las muestras fueron obtenidas al momento de la cosecha durante el mes de diciembre (años 2012, 2013 y 2016). Los especímenes correspondientes al vástago (tallos y folíolos) fueron colectados de la siguiente manera: las muestras de tallo consistieron en trozos de 1 cm tomados al nivel del sexto entrenudo contando desde la base del tallo; los folíolos seleccionados correspondieron al folíolo impar apical de la hoja compuesta inserta en el sexto nudo identificado según el protocolo aplicado para la obtención de las muestras de tallos. Para el estudio de raíz, trozos de 1 cm de longitud fueron obtenidos a 0.5 cm por debajo del nivel del suelo.

A partir de las muestras frescas colectadas de raíz, tallo y folíolos y con la ayuda de un bisturí, se obtuvieron piezas de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> que fueron fijadas con glutaraldehído 3% (v/v) con solución buffer 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4) a 4°C por 12 h. Luego, las muestras fueron lavadas con el buffer durante 24 hs y post-fijadas en una solución acuosa 1 % (w/v) OsO<sub>4</sub> a 20°C durante 2 hs. Todas las muestras fueron lavadas con el buffer fosfato por una hora, posteriormente deshidratadas en una serie ascendente de etanol-acetona (2.1, 2.2, 1.3; acetona pura, de 15 min de duración cada una) a 20°C, y luego embebidas en resina Spurr de baja viscosidad (Spurr,1969).

Para el estudio con microscopía óptica (MO), secciones ultrafinas (1  $\mu$ m espesor) de todos los especímenes fueron coloreadas con azul de toluidina 0.05 % (p/v) (Merck Química Argentina S.A., Argentina) en solución 2.5 % (p/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.1) por 1-6 min a 60°C. Los preparados histológicos fueron examinados y fotografiados utilizando un microscopio Leica DM 2500 (Wetzlar, Germany) equipado con una cámara digital Leica EC3 (Heerbrugg, Switzerland).

### **2.2.5 Determinación de parámetros nutricionales**

Las hojas y los tallos, previamente secados en estufa con aire forzado a 65°C hasta peso constante, fueron molidas en un molino Dalmau (Argentina), hasta que las partículas pasaron a través de una malla de 2 mm. Sobre las muestras molidas, se determinó el contenido de materia seca a 105°C (MS105), utilizando estufas con circulación de aire durante 4 hs y, posteriormente, se determinó el contenido de cenizas (CEN) por ignición en mufla a 600°C por 2 hs, AOAC 942.05 (AOAC International, 1990). El contenido de fibra insoluble en detergente neutro (aFDNmo), fibra insoluble en detergente ácido (FDAmo) y lignina insoluble en detergente ácido (LDA) se determinó según Ankom (2005) y Goering and Van Soest (1970). El contenido de celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEMI) se calcularon por diferencias (Cel = FDAmo - LDA, Hemi = aFDNmo - FDAmo). El valor de nitrógeno (N) total se determinó por el método de Kjeldhal, multiplicando luego por 6,25 para expresarlo como proteína bruta (PB) AOAC 942.05 (AOAC International 1990). Las muestras se caracterizaron además por la cinética de degradación a través de la técnica de producción *in vitro* de gas (PG), Theodorou et al. 1994) y por la digestibilidad *in vitro* a las 48 h de la MS (DMS) y la digestibilidad de la fibra detergente neutro (DFDN).

### 2.2.6 Extracción de polisacáridos de la pared celular

Se realizó la extracción de los polisacáridos de la pared celular de las hojas y de los tallos secos y molidos (2mm) en forma secuencial siguiendo el procedimiento estándar (Fry 1998) para cada repetición de los experimentos llevados adelante en el año 2012 y 2016. Para extraer los pigmentos y compuestos de bajo peso molecular, se efectuó una extracción con etanol 96% v/v (20g/150 ml) durante una hora en dos oportunidades consecutivas a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C (Hermle Z 323 K, Germany), obteniendo un residuo, y dos sobrenadantes que se descartaron. El residuo fue extraído posteriormente en dos oportunidades consecutivas durante una hora con acetona a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo y dos sobrenadantes. Estos sobrenadantes se descartaron. El residuo de la extracción con acetona fue extraído posteriormente con éter etílico durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo denominado insoluble en alcohol (AIR), que se secó al aire bajo campana durante una semana, y un sobrenadante que fue descartado.

Como se presumía que esta fracción AIR contenía un alto porcentaje de glucosa proveniente de polisacáridos ( $\alpha$ -glucanos) de reserva (almidón), se probaron dos maneras para lograr su mejor extracción: a) tratamiento con  $\alpha$ -amilasa y b) extracciones sucesivas con agua caliente durante 3 hs cada una.

Para el tratamiento con  $\alpha$ -amilasa el residuo AIR fue disuelto en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9) y la enzima ( $\alpha$ -amilasa tipo VI-B, origen: páncreas bovino; Sigma) se incorporó en tres agregados a lo largo de 24 hs con agitación constante a temperatura ambiente. La cantidad de  $\alpha$ -amilasa necesaria se determinó de acuerdo al contenido de glucosa de la muestra y los datos de actividad de la enzima provistos por el fabricante. La muestra fue luego dializada

(MWCO 3500) y liofilizada. La extracción con agua se hizo realizando dos, tres y cuatro tratamientos sucesivos durante 3hs en agua destilada (20 g/L) a 100 °C y la suspensión obtenida fue centrifugada a 8500 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo y dos sobrenadantes que fueron dializados (MWCO 6-8,000) en agua corriente durante 72 hs y luego en agua destilada por 4 hs, después fueron liofilizados.

En función de los resultados encontrados, las extracciones de los residuos AIR de todas las muestras se realizaron mediante dos tratamientos sucesivos durante 3hs en agua destilada (20 g/L) a 100 °C y la suspensión obtenida fue centrifugada a 8500 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo y dos sobrenadantes que fueron dializados (MWCO 6-8,000) en agua corriente durante 72 hs y luego en agua destilada por 4 hs, después fueron liofilizados.

Luego los residuos luego fueron secuencialmente extraídos del mismo modo y en dos oportunidades sucesivas cada uno con CDTA 0.05 M a pH= 6, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, KOH 1M - NaBH<sub>4</sub> 10mM y en tres oportunidades sucesivas con KOH 4M - NaBH<sub>4</sub> 10mM. En cada caso, cada suspensión obtenida fue centrifugada a 9500 rpm a 4 °C (Hermle Z 323 K, Germany) obteniendo un residuo y dos sobrenadantes (extractos), que se trataron separadamente. Cada uno de ellos fue dializado y liofilizado para las determinaciones posteriores. Se obtuvieron en total para cada tratamiento once extractos, y un residuo final (Rf).

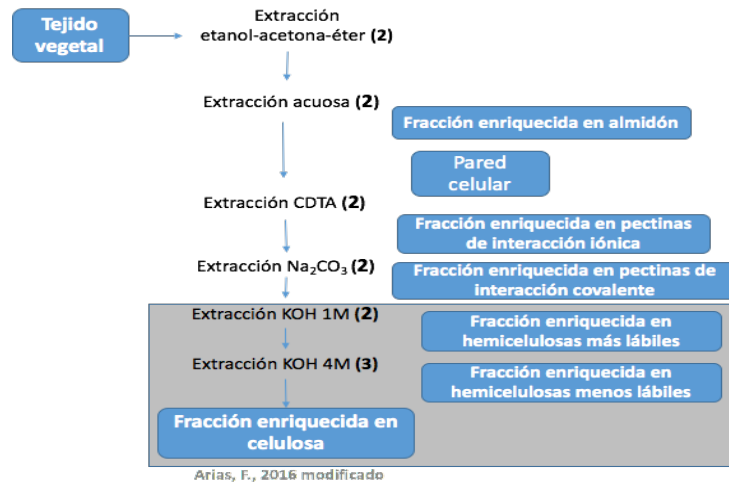


Figura 9: Extracción secuencial de pared celular. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos indicados. Los números entre paréntesis indican el número de extracciones secuenciales realizadas con cada solvente.

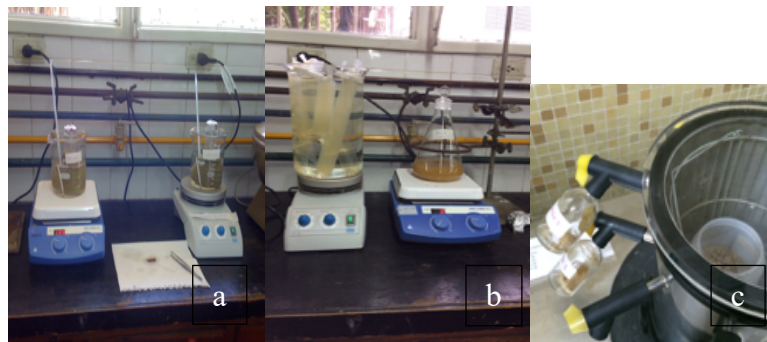


Figura 10 a-b-c: a) extracción acuosa con temperatura; b) proceso de diálisis de los residuos y los extractos obtenidos; c) proceso de liofilizado del material obtenido en las extracciones.

### **2.2.7 Métodos generales de análisis de componentes de la pared**

#### **2.2.7.1. Determinaciones colorimétricas del contenido en hidratos de carbono totales y el contenido de ácidos urónicos.**

El contenido de azúcares totales fue analizado con el método fenol-ácido sulfúrico ( $\text{PhOH-H}_2\text{SO}_4$ , Dubois et al. 1956). Este método se basa en la acción del ácido concentrado sobre los azúcares, que lleva a la deshidratación y formación de derivados del furfural. Estos compuestos reaccionan con fenol para dar productos altamente coloreados con máximo de absorbancia a 490 nm. Se utilizó una solución de galactosa en agua destilada como estándar para la realización de la curva patrón; el rango de concentraciones utilizado fue de 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

El contenido de ácidos urónicos se determinó por el método de Filisetti-Cozzi et al. 1991. Este método es altamente selectivo para ácidos urónicos en presencia de importantes cantidades de azúcares neutros. Se forma un complejo rosado por reacción con 3-fenilfenol y se mide la absorbancia a 525 nm. Se utilizaron soluciones de ácido galacturónico en agua para realizar la curva patrón.

En este trabajo, se utilizó la adaptación de ambos métodos para material insoluble (Ahmed y Labavitch 1977), lo que implica una digestión previa del material con ácido sulfúrico concentrado, hasta disolución completa del mismo.

#### **2.2.7.2. Determinación de la composición en monosacáridos neutros.**

Se realizó la determinación de los monosacáridos componentes de los extractos obtenidos en la secuencia extractiva descrita y del residuo final (Rf) por cromatografía gaseosa (CG) utilizando detección por ionización de llama (FID) o espectrometría de masa como detectores. Para ello, en primer lugar, las muestras fueron hidrolizadas. La hidrólisis consiste en la ruptura de los enlaces glicosídicos de los polisacáridos, quedando los monosacáridos estables en el medio de reacción ácido.

Luego de la hidrólisis, los monosacáridos se modifican químicamente (se derivatizan) de forma tal de obtener derivados volátiles en las condiciones en que se realiza la cromatografía gaseosa. La derivatización incluye la reducción de los monosacáridos a alditoles y luego la acetilación de los mismos por reacción del anhídrido acético con cada uno de los OH del alditol (conversión de los monosacáridos a sus correspondientes acetatos de alditol), utilizando piridina como catalizador de la reacción.

Dada la baja solubilidad de muchas de las muestras a analizar, se optó por aplicar en todos los casos un tratamiento previo en medio fuertemente ácido, con el fin de lograr una disolución completa de las mismas. Por ello, las muestras se disolvieron en ácido trifluoroacético 13M (TFA, 37°C, 60 min), seguidamente se llevó la concentración del ácido a 11,5M (100°, 60 min), y por último a 2M (120°, 90 min), para alcanzar las condiciones habituales de hidrólisis para polisacáridos (Morrison, 1988). Luego, los azúcares fueron reducidos a alditoles mediante tratamiento con borohidruro de sodio en  $\text{NH}_3$  1M (24 hs, temperatura ambiente). Posteriormente, se pasaron por una columna con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ), eluyéndose con agua destilada. Luego de la evaporación del agua, el exceso de reactivo fue eliminado agregando metanol y llevando a seco. Este paso se repitió cinco veces. Los alditoles obtenidos fueron derivatizados por acetilación, mediante reacción con anhídrido acético y piridina (1:1; 100°C, 45 min). La mezcla de acetatos de alditoles se extrajo con cloroformo y seguidamente se realizaron lavados con agua destilada y solución saturada de bicarbonato de sodio; para eliminar, por último cualquier resto de agua presente en la fase clorofórmica con sulfato de sodio anhidro. Dicha fase fue llevada a seco y mantenida a -20°C hasta ser analizada por cromatografía gaseosa (CG).

Por otra parte, para detectar y cuantificar los ácidos urónicos presentes en la pared se cuantificaron los ácidos galacturónico, glucurónico y ácido 4-O-metilglucurónico de



acuerdo a la metodología de Lehrfeld 1987 y Walters y Hedges 1988, modificada por Zelaya et al. 2017, que permite su detección y cuantificación por cromatografía gaseosa (GC/MS). Las muestras fueron hidrolizadas con TFA 0.5 M (135°C, 2 hs). Posteriormente, luego de eliminar el ácido, fueron tratadas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M y luego se le agregó NaBH<sub>4</sub> al 4% para reducir las aldosas a alditoles y alduronatos a aldolactonas, que fueron tratados con piridina (1:1) y N-propilamina (1:1) durante 30 minutos a 55 °C. Luego, la muestra fue evaporada hasta secarla totalmente. Finalmente se agregó anhídrido acético y piridina (1:1) y se calentó a 95°C durante 45 minutos para obtener los correspondientes acetatos de alditol y acetatos de N-propilaldonamidas. Se utilizó mio-inositol como estándar interno. La respuesta relativa de los derivados de los ácidos urónicos fue determinada utilizando ácido D-(+)-glucurónico,  $\gamma$ -lactona (Sigma) y ácido D-(+)-galacturónico (Fluka) como estándares. Se estimaron los factores de recuperación relativos (1,57 para ácido glucurónico y ácido 4-O-metilglucurónico y 2,29 para el ácido galacturónico (Zelaya et al. 2017). Utilizando esta metodología, no fue posible cuantificar azúcares neutros y ácidos urónicos al mismo tiempo.

Las muestras fueron analizadas usando un cromatógrafo gas-líquido Agilent 7890A (Avondale PA, USA) equipado con dos detectores, uno de ionización de llama (FID) y otro de espectrometría de masa por impacto electrónico Agilent 5977<sup>a</sup> (MS-EI). En el caso de CG FID, se utilizó N<sub>2</sub> como gas portador y una columna capilar SP-2330 (Supelco, Bellefonte PA, USA) de 30m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,20  $\mu$ m de espesor de la fase líquida, con un flujo de 1,3 ml min<sup>-1</sup> y una relación de split 25:1. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C y las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: (a) de 200°C a 240°C a 2°C min<sup>-1</sup>, seguido por 15 min sosteniendo esa temperatura, para los acetatos de alditoles. (b) de 235°C a 240°C a 2°C min<sup>-1</sup>, seguido por 30 min sosteniendo esa temperatura, para la cuantificación de ácidos urónicos. A

partir de los cromatogramas obtenidos, se realizó la conversión de la información de áreas de pico a porcentajes molares de cada unidad. Al utilizar CG/MS, se utilizó la misma columna que en el caso anterior, pero en este caso, con He como gas portador con un flujo de  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$  trabajando a 70 eV, la temperatura del inyector fue de  $250^{\circ}\text{C}$ .

En el cromatograma obtenido, una vez identificados los componentes de las muestras respecto a una corrida patrón, se cuantifica su abundancia de acuerdo al área bajo los picos, cuyo valor es calculado por el software del integrador. Para evitar sobre o subestimaciones, se realiza una corrección tomando en cuenta el peso molecular (PM) de cada azúcar. Los valores de cada área se dividirán por los siguientes valores:

-desoxihexosas (ramnosa y fucosa) 376

-pentosas (arabinosa y xilosa) 362

-hexosas (manosa, galactosa y glucosa) 434

Se sumaron los valores obtenidos y se calculó el porcentaje de cada valor (Área/Peso Molecular (PM)) respecto de ese total (Sumatoria Área/PM). Esto permitió calcular la composición en moles % de cada monosacárido.

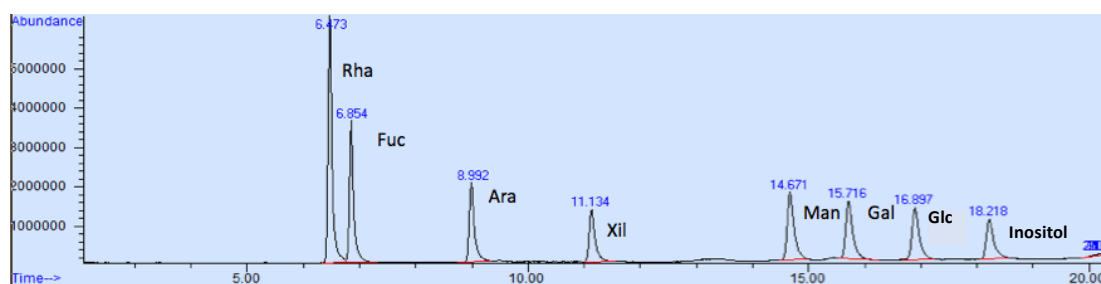


Figura 11: Cromatograma de una mezcla de patrones indicando en cada pico el monosacárido correspondiente

Estos resultados dieron lugar a los datos mostrados en las tablas, realizando los siguientes cálculos:

Al valor de azúcares totales, se le restó lo que corresponde a ácidos urónicos, que se obtienen de la determinación colorimétrica correspondiente. El valor resultante corresponde a azúcares neutros.

En los extractos solubles del análisis de composición en monosacáridos, se determina cuál es la contribución de la glucosa. Ese porcentaje se aplica al valor de azúcares neutros y corresponde al porcentaje de  $\alpha$ -glucanos. El % restante más el % de ácidos urónicos representa el total de polisacáridos de pared.

#### **2.2.8 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA):**

La cuantificación de las fitohormonas se realizó por HPLC-MS-MS en colaboración con el Dr. Axel Mithoefer del Max Planck de Ecología Química utilizándose el método de Vadassery et al. (2012) adaptado a soja.

Para ello, se pesaron 10mg de muestra liofilizada y finamente particulada (hoja) y se extrajeron con 1000 $\mu$ L de metanol:agua(7:3), agregándose 20 $\mu$ g/mL de estándares deuterados de JA, JA-isoleucina y SA. Se mezcló el homogenato por 30 min y luego se centrifugó a 14.000 rpm x 20 min a 4°C, y se tomó el sobrenadante. Luego, se realizó otra extracción con 500ml de metanol y se llevó a cabo el mismo procedimiento para hacer un pool de los dos sobrenadantes. Los extractos combinados se evaporaron a presión reducida a 30°C y redisolviéron en 500 $\mu$ l de metanol, para analizarlos en un HPLC Agilent 1200 equipado con una columna C18 Zorbax Eclipse XDB (4,6 mm, 1,8 mm; Agilent). Se utilizó agua acidulada con ácido fórmico (0,05%) y acetonitrilo. Como detector acoplado al HPLC, se utilizó un espectrómetro de masa API 3200, equipado con una fuente de ionización Turbospray y un analizador triple cuadrupolo. Se operó en modo negativo y el análisis de iones se realizó por MRM (monitoreo de reacción múltiple) con las siguientes *m/z* de pares de iones (precursor-fragmento): JA 209>59 y 215>59; SA 137>93 y 141>97. La concentración de las hormonas se determinó mediante las

respectivas curvas de calibración con ajuste lineal, obteniendo los resultados en ng de hormona x g peso seco<sup>-1</sup> relativizando a la intensidad del compuesto deuterado correspondiente (Dillon et al. 2018).

### **3. Capítulo 3 Morfología y respuestas morfofisiológicas resultantes del estrés abiótico salino y biótico**

#### **3.1 Introducción**

Cuando las plantas se ven afectadas por situaciones desfavorables para su desarrollo producidas por condiciones de estrés abiótico o biótico, retardan su crecimiento y su productividad. El metabolismo vegetal se ve perturbado, ya sea por inhibición de enzimas metabólicas, menor cantidad de sustratos, demanda excesiva de ciertos compuestos metabólicos o por una combinación de todos estos factores como se describió en el Capítulo 1 Introducción general.

En este trabajo de Tesis, se buscó observar los efectos del estrés salino (abiótico) en dos familias de medios hermanos que presentaban distinta susceptibilidad para ver si presentaban un comportamiento diferencial respecto a sus parámetros de crecimiento y posibles alteraciones estructurales.

Asimismo, la herbivoría producida por insectos u otros animales, genera una serie de respuestas a nivel vegetal que dependerán del bioagresor del que se trate. Estas respuestas serán de índole constitutiva o inducida. Las respuestas constitutivas o estructurales incluyen barreras físicas como ser ancho de cutícula, composición de la pared celular y presencia de metabolitos secundarios que inhiben la alimentación, tasa de reproducción o el desarrollo de los herbívoros (Walling 2000; War et al. 2012; Steenbergen et al. 2017). Respecto al efecto del estrés biótico, en este trabajo de Tesis, para evaluar si se producen cambios a nivel de pared celular de hojas de *Lotus tenuis* por efecto de un estrés biótico y, en caso afirmativo, la naturaleza de los mismos, el efecto en los parámetros de crecimiento y la existencia de cambios estructurales, se evaluaron, en particular, los efectos producidos por herbivoría de individuos de *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Orden Thysanoptera: Thripidae), conocido vulgarmente como “trips del poroto”. Esta especie

suele encontrarse sobre las hojas de distintas plantas, preferentemente de la familia Fabáceas, tales como maní y soja. Las larvas y los adultos de trips al alimentarse, insertan sus estiletes y succionan el contenido celular (Kindt et al., 2006), las células afectadas colapsan o se llenan de aire. La hoja presenta lesiones superficiales de color blanquecino a gris plateado. También, se observan puntos pardo oscuro como consecuencia de las deyecciones del insecto. El daño puede observarse en ambas caras de las hojas, reduciéndose a parches, pero si el ataque es intenso puede abarcar la totalidad de la hoja. Los daños de esta especie se observan sobre hojas maduras. Como consecuencia, se observa reducción de la fotosíntesis, afectando el crecimiento y la reproducción de la planta (Morse and Hoddle, 2006; Mound, 2005).

### 3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la composición química y estructural de las paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis* en estado vegetativo.
2. Determinar la variación de las características químicas de las paredes celulares de hojas y tallos de líneas de *L. tenuis* tolerantes o susceptibles a ambientes salinos en estado vegetativo cultivadas con diferentes niveles de cloruro de sodio en el suelo.
3. Determinar la variación de las características químicas de las paredes celulares de hojas de *Lotus tenuis* sometidos a herbivoría por Trips.

#### 3.2.1 Hipótesis de trabajo:

H1) El estrés salino produce cambios en la composición química de la pared celular de tallos y hojas en estado vegetativo de *L. tenuis*, y este efecto es diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles al estrés salino.

- a. La modificación en las paredes celulares de *L. tenuis* y en la estructura de los polisacáridos que las constituyen es uno de los mecanismos importantes en la

aclimatación de estas plantas terrestres a los ambientes de alto grado de salinidad. Esta modificación no sólo implica un cambio en el grosor de las paredes y el tamaño de las células, sino que además podría tener consecuencias en la composición en los polisacáridos de la pared y su estructura fina.

- b. La diferencia en el comportamiento de las variedades resistente y susceptible al estrés salino en *L. tenuis* podría relacionarse, en parte, con diferencias en las paredes celulares de las mismas.

H2) Los cambios morfológicos y químicos de las paredes celulares de *L. tenuis* debido al estrés salino y el biótico afectan la calidad nutricional de los tallos y las hojas de las plantas en estado vegetativo, afectando su digestibilidad potencial.

- a. Además del descenso en la biomasa total como consecuencia de la adaptación al estrés salino y el biótico, el engrosamiento en las paredes celulares y otros cambios a nivel molecular podrían producir una diferencia en la digestibilidad potencial de *L. tenuis*.

### **3.3 Materiales y métodos:**

De acuerdo a lo presentado en 2. Materiales y métodos; 2.1 (Germinación, bandejas y transplante en macetas); 2.2 (Tratamientos); 2.3 (Medición de variables del ambiente) y con el objetivo de determinar el efecto del estrés salino sobre distintos parámetros de crecimiento y nutricionales y cambios en la pared celular de hojas y tallos, se realizaron los siguientes experimentos utilizando semillas de *Lotus tenuis* de dos familias de medios hermanos (FMH) que presentaban distinta susceptibilidad frente al estrés salino.

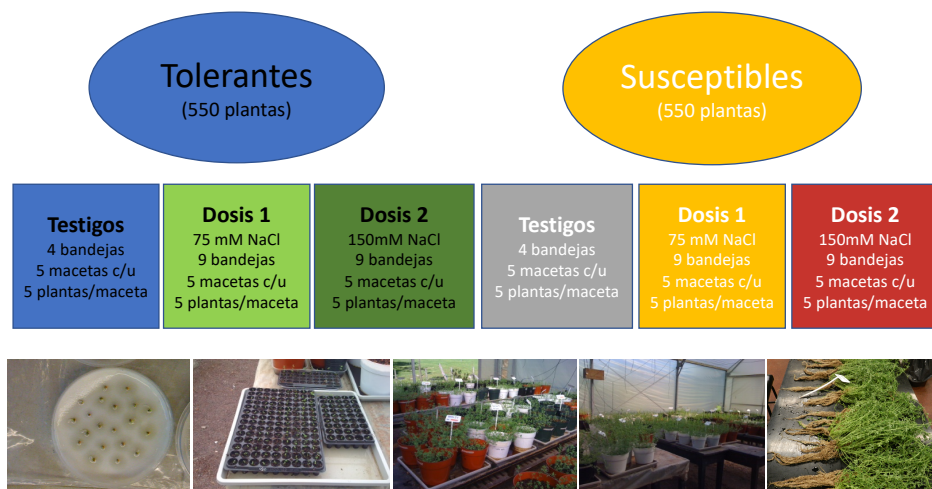


Figura 12: Esquema del experimento para evaluar el efecto del estrés abiótico salino producido en plantas de *Lotus tenuis* que presentaban distinta tolerancia frente al estrés. Imágenes a-d: a: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas; d: vista general del experimento bajo invernáculo; e: aspecto general de las plantas cosechadas

Luego de obtenidas las plantas se realizaron las mediciones de los siguientes parámetros de crecimiento:

- peso (en gramos) de la biomasa de los tallos y las hojas
- % de materia seca (MS) de los tallos y las hojas
- peso (en gramos) de la biomasa de las raíces
- % de MS de las raíces
- % de la biomasa de las raíces
- Peso de la MS de tallos por planta
- Peso de la MS de las hojas por planta
- Largo de las raíces
- Largo de los tallos
- Número de ramificaciones



Por otra parte, para evaluar el efecto del estrés biótico producido por trips sobre plantas de *Lotus tenuis* se realizó un experimento en donde se trabajó con 100 plantas de esta especie bajo invernáculo. Las mismas provienen de semillas de la FMH 490 de la estación experimental INTA Pergamino. Las plántulas se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en 2. Materiales y métodos; 2.1 (Germinación, bandejas y transplante en macetas). Se colocaron 5 plántulas por cada maceta y se dispusieron 5 macetas por cada bandeja. Se trabajó con 20 macetas con 5 plantas cada una. Las 100 plantas obtenidas fueron cubiertas con una malla fina de tul (carpas) para evitar el ataque de insectos. El riego se hizo con agua corriente día por medio manteniendo la capacidad de campo. En el mes de noviembre cuando las plantas presentaban un buen desarrollo y antes que comenzara la floración se las dividió en dos, unas serían las plantas testigo y otras las plantas atacadas. Cada tratamiento fue dividido al azar en tres para trabajar con tres réplicas que se colocaron en bandejas diferentes. Nuevamente se cubrió a todas las plantas con una malla fina de tul pero esta vez en forma independiente todas las atacadas juntas y todas las testigo juntas. A las identificadas como atacadas se les colocaron trips a razón de 25 trips por día, durante 4 días. A la semana siguiente se agregaron 30 trips más, ya que no se evidenciaba un ataque significativo.

Cuando aparecieron las primeras flores se levantó el experimento. Se llevó las plantas al laboratorio. Se separó la biomasa aérea y se le determinó el peso.

Se determinó porcentaje de materia seca, de los tallos y las hojas por secado a 65°C en estufa a aire forzado hasta que no se detectó variación en el peso. Se separaron tallos y hojas.

Además, se realizaron cortes transversales de hojas, tallos y raíces para el experimento de estrés abiótico salino y cortes transversales de hojas para el experimento

de estrés biótico como fue descrito en el punto 2.4 en Materiales y métodos, para realizar los estudios anatómicos estructurales por medio de microscopía óptica.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 ESTUDIO EXOMORFOLÓGICO

##### 3.4.1.a Estudio exomorfológico de las plantas sometidas al estrés salino

Se evaluaron los cambios morfológicos de las plantas tolerantes y susceptibles a la salinidad cultivadas en los diferentes tratamientos: Testigo Tolerante (TT), Dosis 1 Tolerante (D1T) y Dosis 2 Tolerante (D2T), Testigo susceptible (TS), Dosis 1 Susceptible (D1S) y Dosis 2 Susceptible (D2S). A continuación se describen los cambios exomorfológicos y estructurales observados en las plantas de *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) creciendo bajo condiciones de estrés salino.

##### 3.4.1.a.1 Análisis de los parámetros de crecimiento evaluados

##### 3.4.1.a.1.1 Porcentaje de materia seca de tallos y hojas

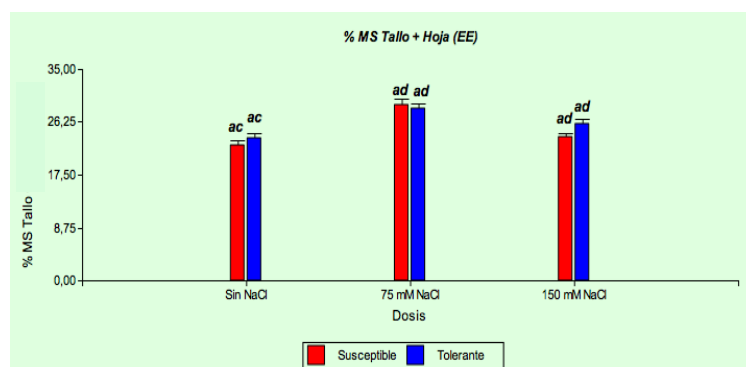


Figura 13: Porcentaje de MS de tallo y hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto al porcentaje de materia seca de tallos y hojas no se registraron diferencias significativas entre genotipos ( $p=0,2295$ ), pero sí entre las dosis de tratamiento salino ( $p<0,001$ ). Se encontraron diferencias significativas entre los testigos (media: 21,43% MS tallo y hojas) y los tratamientos Dosis 1 (media: 25,86 % MS tallo y hojas) y Dosis 2

(media: 23,73 % MS tallo y hojas) El porcentaje de materia seca se incrementó en un 15% frente al estrés salino (Figura 13).

#### 3.4.1.a.1.2 Gramos de materia seca de tallos y hojas por planta

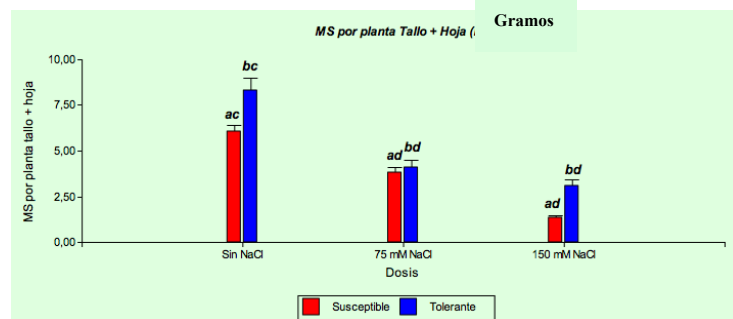


Figura 14: Gramos de MS por planta de tallos y hojas por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto a los gramos de materia seca por planta (tallos mas hojas), se encontraron diferencias significativas entre genotipos ( $p=0,0163$ ). El genotipo susceptible tuvo un 31.9% menos de materia seca en gramos por planta respecto al tolerante ( $p<0,05$ ). En relación con el tratamiento salino se observó una diferencia significativa entre los testigos y a las Dosis 1 y 2. Las plantas regadas con la Dosis 2 presentaron un 70% menos de materia seca que las plantas testigo ( $p<0,001$ ); (Figura 14).

#### 3.4.1.a.1.3 Gramos de biomasa de tallos y hojas por planta

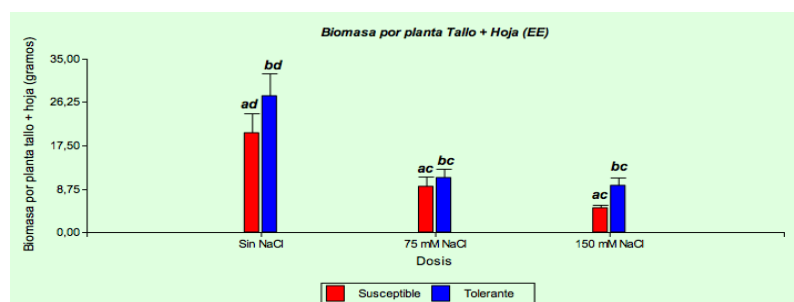


Figura 15: Gramos de biomasa de tallos y hojas por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

En la observación de los resultados encontrados para los gramos de biomasa de tallos y hojas se hallaron diferencias significativas entre los genotipos ( $p=0,0118$ ), el genotipo tolerante produjo un 17,5% más de biomasa por planta que el susceptible. Respecto al tratamiento salino se encontraron diferencias significativas entre los testigos y las plantas regadas con las dosis salinas, observando un 37,87% menos de biomasa en gramos en las plantas regadas con la dosis de 150 mM de sal respecto a los testigos ( $p<0,001$ ); (Figuras 15 y 22).

#### 3.4.1.a.1.4 Porcentaje de materia seca de raíz

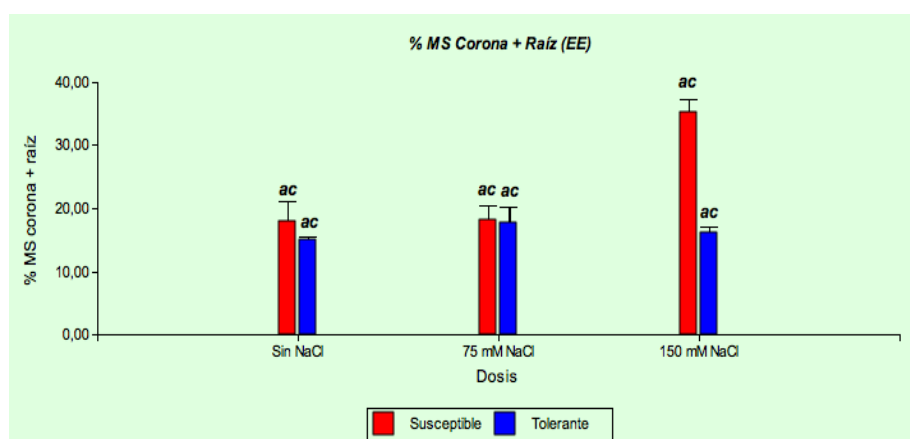


Figura 16: Porcentaje de MS de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto al porcentaje de materia seca de raíz, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ( $p=0,05$ ), ni entre las dosis de sal en el riego ( $p=0,1$ ); (Figura 16).

### 3.4.1.a.1.5 Gramos de materia seca de raíz por planta

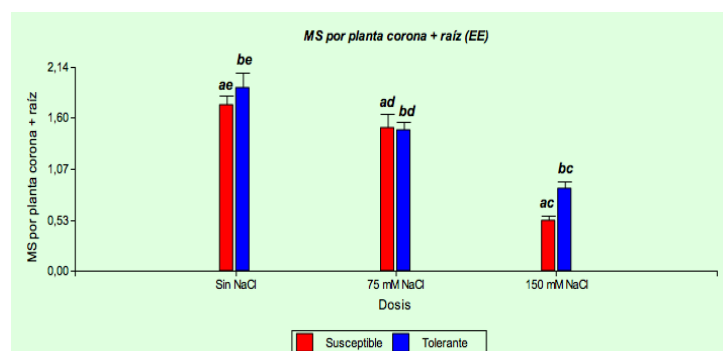


Figura 17: Gramos de MS de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto a los gramos de materia seca de raíz producidos, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ( $p=0,03$ ) produciendo un 16,6% menos gramos de materia seca de raíz el genotipo susceptible. En relación a las dosis de riego ( $p<0,0001$ ), se observó menor producción de gramos de materia seca de raíz a medida que se acentuaba el estrés salino, reduciéndose en un 25,1% en la Dosis 1 y un 55,4% en la Dosis 2, respecto a los testigos (Figura 17).

### 3.4.1.a.1.6 Gramos de biomasa de raíz por planta

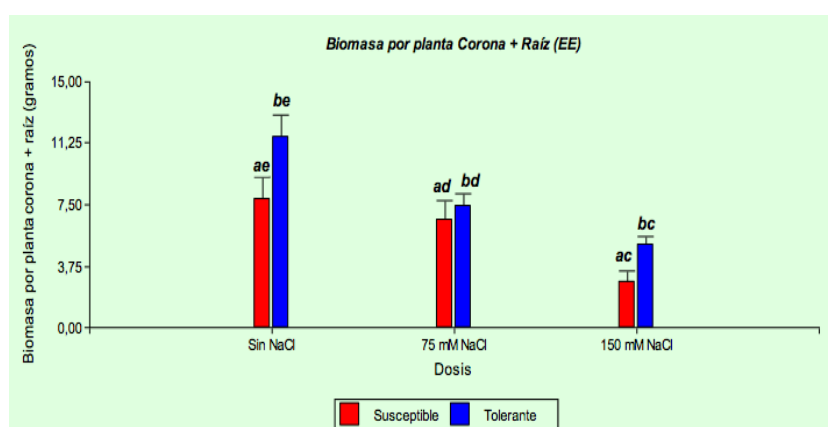


Figura 18: Gramos de biomasa de raíz para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto a la biomasa de raíz encontrada, se observaron diferencias significativas entre los genotipos ( $p=0,01$ ) y entre las plantas regadas con soluciones salinas de diferentes concentraciones (Dosis 1 y 2) ( $p<0,0001$ ). El genotipo susceptible presentó un 28,42% menos biomasa de raíz que el tolerante. Los gramos de biomasa producidos también disminuyeron a medida que se aumentaba el contenido de sal en el agua de riego, reduciéndose en 28% en la Dosis 1 y 59,9% en la Dosis 2, respecto al testigo (Figura 18 y 22).

#### 3.4.1.a.1.7 Longitud de los tallos

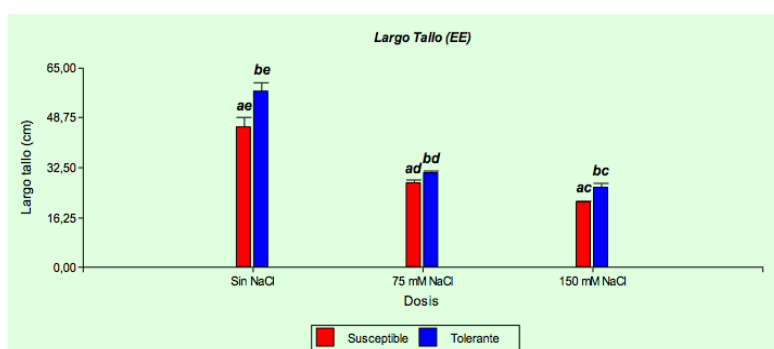


Figura 19: Longitud de los tallos en centímetros para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Para la variable longitud de los tallos, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ( $p=0,0004$ ) y entre las dosis de riego ( $p<0,0001$ ). El largo de los tallos del genotipo susceptible fue menor en un 5,16% respecto al genotipo tolerante. Con respecto al tratamiento salino, la longitud de los tallos disminuyó a medida que se aumentaba la cantidad de sal en el agua de riego, reduciéndose en 43,5% en las plantas regadas con la Dosis 1 y 54,0% en las regadas con la Dosis 2, respecto a los testigos (Figura 19 y 22).

### 3.4.1.a.1.8 Cantidad de ramificaciones por planta

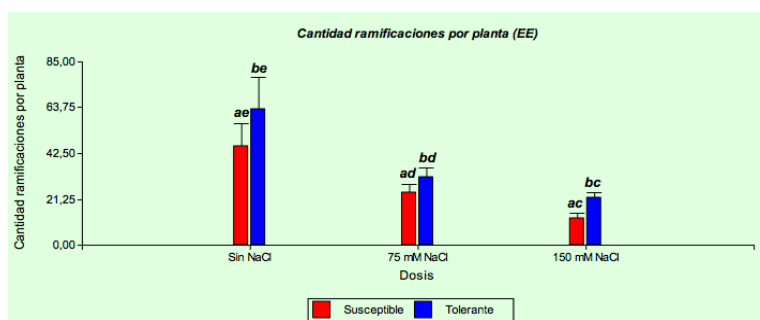


Figura 20: Cantidad de ramificaciones por planta para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Como en el caso anterior, al analizar la cantidad de ramificaciones por planta se encontraron diferencias significativas entre genotipos ( $p=0,02$ ), presentando el genotipo susceptible un 10,6% menos de ramificaciones. Respecto a las dosis de sal en el agua de riego también se encontraron diferencias significativas ( $p<0,0001$ ). La cantidad de ramificaciones por planta se redujo 43,5% en las plantas regadas con la Dosis 1 y 68,1% en las regadas con la Dosis 2. (Figura 20 y 22).

### 3.4.1.a.1.9 Largo de la raíz en centímetros

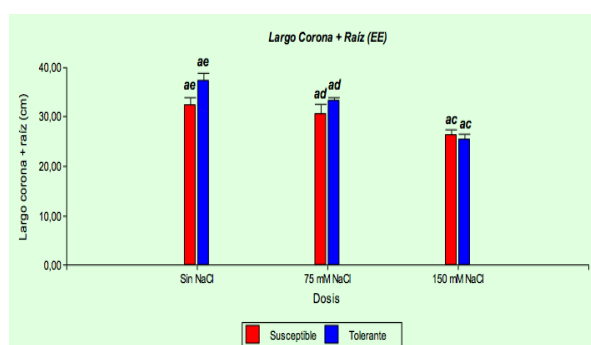


Figura 21: Largo de la raíz en centímetros para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto al largo de la raíz, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos ( $p=0,06$ ), pero sí se encontraron diferencias entre las dosis de sal en el riego ( $p<0,0001$ ). Se observó una reducción en el largo de la raíz entre los testigos (media=34,8

cm largo raíz), la Dosis 1 (media=32,0 cm largo raíz) y la Dosis 2 (media=25,8 cm largo raíz). (Figura 21 y 22).



Figura 22: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Aspecto general de las plantas: A-C, Genotipo Tolerante A: testigo tolerante, B: dosis 1 tolerante, C: dosis 2 tolerante; D-E, Genotipo susceptible, D: testigo susceptible, E: dosis 1 susceptible, F: dosis 2 susceptible. Escalas A-F: 30 cm.

### 3.4.1.b Estudio exomorfológico de las plantas sometidas al estrés biótico

#### 3.4.1.b.1 Análisis de los parámetros de crecimiento evaluados

De acuerdo a las observaciones realizadas se presentan a continuación los resultados encontrados respecto a los parámetros de crecimiento evaluados respecto al estrés biótico producido por trips (Figura 26).



### 3.4.1.b.1.1 Porcentaje de materia seca y gramos de materia seca de tallos y hojas

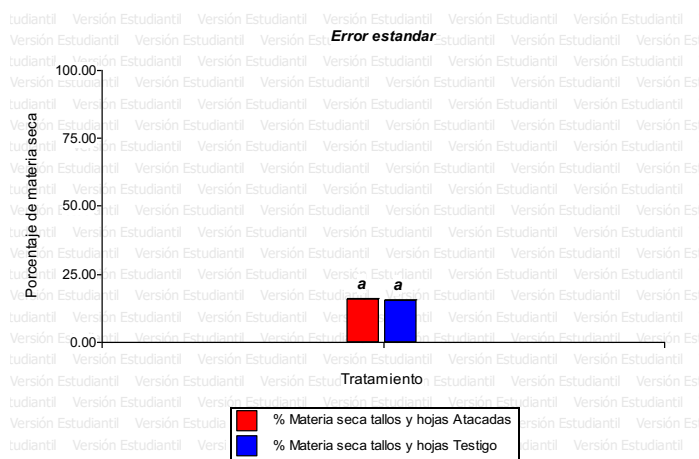


Figura 23: Porcentaje de materia seca de tallos y hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Frente al estrés biótico producido por trips, no se encontraron diferencias significativas respecto al porcentaje de materia seca de tallos y hojas de las plantas atacadas y las testigo. ( $p=0,5$ ); (Figura 23).



Figura 24: Gramos de materia seca de tallos y de hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Frente al estrés biótico producido por trips, no se encontraron diferencias significativas respecto al contenido de materia seca de tallos ( $p=0,7$ ); y hojas ( $p=0,4$ ) en gramos entre las plantas atacadas y las testigo (Figura 24).

### 3.4.1.b.1.2 Gramos de biomasa de tallos y hojas

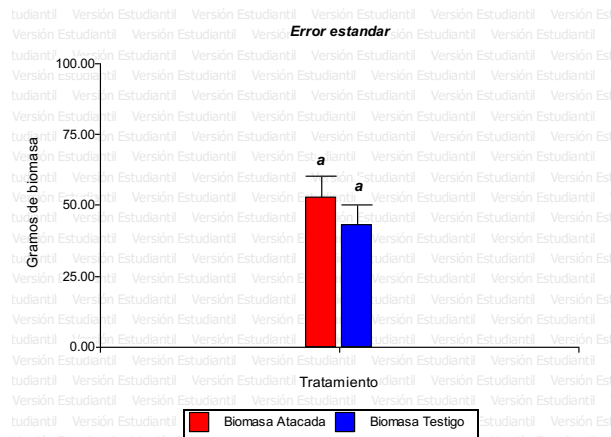


Figura 25: Gramos de biomasa de tallos y hojas de las plantas atacadas y las testigo. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

En la observación de los resultados encontrados para biomasa de tallos y hojas entre las plantas atacadas y las testigo, no se hallaron diferencias significativas ( $p=0,3824$ ); (Figura 25).

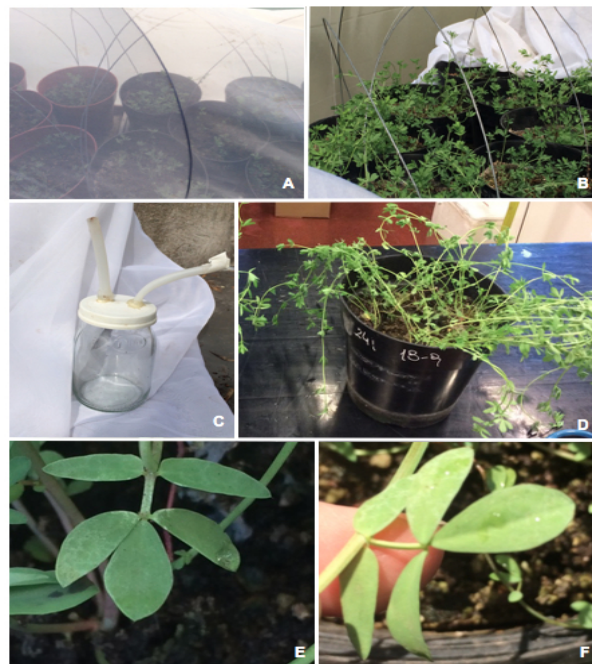


Figura 26: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Ataque de trips. Experimento 2013-2016: A-B, macetas con cobertura en el invernáculo: A, aspecto general de las plantas jóvenes con cobertura, B; detalle de las plantas en estado avanzado de crecimiento; C, trampa de captura con trips; D, planta atacada con trips, aspecto general; E-F: hojas atacadas.

A continuación se presentan los resultados de las observaciones de los cortes transversales de las hojas, los tallos y las raíces por microscopía óptica que fueron realizados para observar si se encontraban diferencias desde el punto de vista anatómico estructural como consecuencia del estrés salino recibido y también los correspondientes a los cortes transversales de hojas del experimento sobre estrés biótico.

### **3.4.2 ESTUDIO ANATÓMICO ESTRUCTURAL**

#### **3.4.2.a Estrés abiótico salino: Observaciones con microscopio óptico**

Se realizó la descripción de cortes transversales de tallo, de hoja y de raíz de las muestras: Testigo Tolerante (TT), Dosis 1 tolerante (D1T) y Dosis 2 Tolerante (D2T), Testigo susceptible (TS), Dosis 1 Susceptible (D1S) y Dosis 2 Susceptible (D2S), analizadas en el presente estudio.

##### **3.4.2.a.1 Observaciones de los tallos en corte transversal**

**TESTIGO TOLERANTE (TT):** El tallo primario corresponde a una eustela con 8 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario incipiente. La epidermis es uniestratificada, con células epidérmicas voluminosas oblongas a redondeadas, con la cutícula estriada y con la pared tangencial externa de las células más engrosada que la pared tangencial interna. Los estomas se ven superficiales y con los repliegues cuticulares conspicuos. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico y consta de 5 a 7 capas de células más o menos isodiamétricas a oblongas, con los cloroplastos en posición parietal. Se observa xilema secundario, floema secundario y en la periferia de éste último paquetes de fibras protofloemáticas con paredes engrosadas que apenas toman la coloración con azul de toluidina, lumen circular a oblongo distinguible. La médula sólida presenta células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro. En posición central se ve un espacio intercelular esquizógeno de forma irregular (Figura 27 A-D)

**DOSIS 1 TOLERANTE (D1T):** El tallo primario corresponde a una eustela con 9 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario incipiente. La epidermis es uniestratificada, con células epidérmicas voluminosas oblongas a redondeadas, con la pared tangencial externa más engrosada que la pared tangencial interna. En ocasiones se observan sobre la pared tangencial externa áreas translúcidas (Figura 2 C flecha). Respecto del control, con azul de toluidina las paredes tangenciales se tiñen de color púrpura más intenso y la cutícula se observa conspicuamente estriada. Los estomas se ven con los repliegues cuticulares demarcados. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico que consta de 5 a 7 capas de células más o menos isodiamétricas a oblongas, con los cloroplastos en posición parietal. Se observa floema secundario y en la periferia de éste último paquetes de fibras protofloemáticas, con paredes visiblemente engrosadas que apenas toman la coloración con azul de toluidina, el lumen de las fibras es reducido y el contorno poligonal; hacia el interior el xilema secundario. La médula sólida presenta células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro (Figura 28 A-F).

**DOSIS 2 TOLERANTE (D2T):** El tallo primario corresponde a una eustela con 8 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario incipiente. La epidermis se presenta uniestratificada, con células epidérmicas voluminosas, oblongas a redondeadas, respecto del control, las paredes tangenciales externas e internas de las células epidérmicas se ven más engrosadas y se tiñen de color púrpura intenso con azul de toluidina. La cutícula se observa conspicuamente estriada y toma la coloración celeste con azul de toluidina. Los estomas se ven algo hundidos y con repliegues cuticulares notables. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico y consta de 5-7 capas de células más o menos isodiamétricas, oblongas a

irregulares, algo más grandes que las presentes en el control y con los cloroplastos en posición parietal de mayor tamaño.

Se observa xilema secundario y floema secundario. Los elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras del xilema secundario presentan menor diámetro y paredes más engrosadas respecto del control. En la periferia del floema se observan paquetes de fibras protofloemáticas de contorno poligonal, con paredes visiblemente engrosadas que se tiñen intensamente con azul de toluidina, lumen circular a oblongo distinguible. La médula sólida presenta células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro (Figura 29 A-F; Figura 30 A-B)

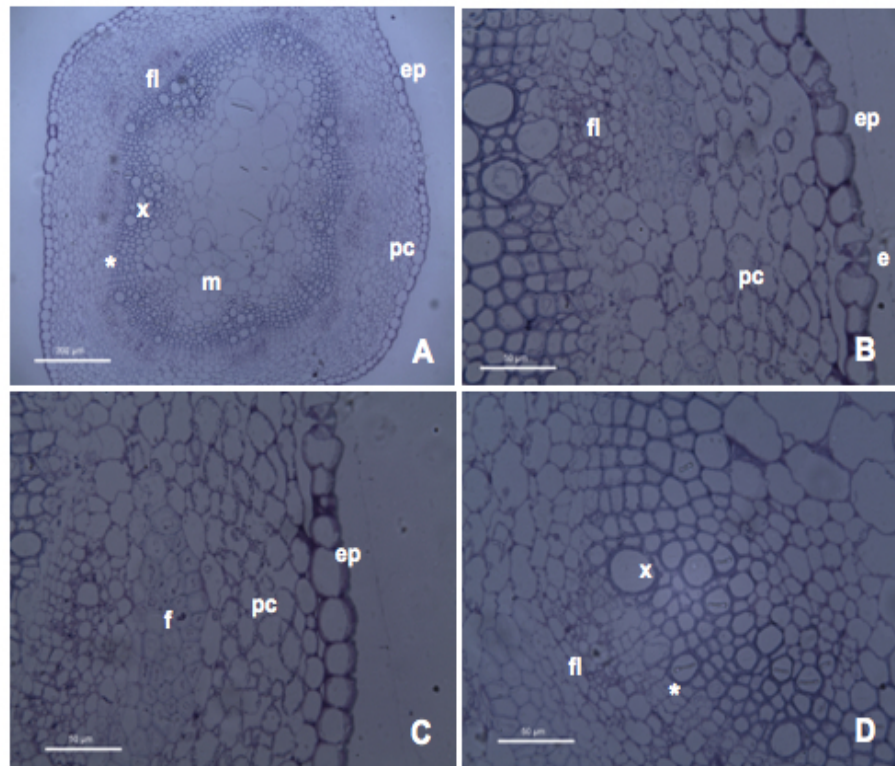


Figura 27: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Tallo Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200 µm; B-D=50 µm.



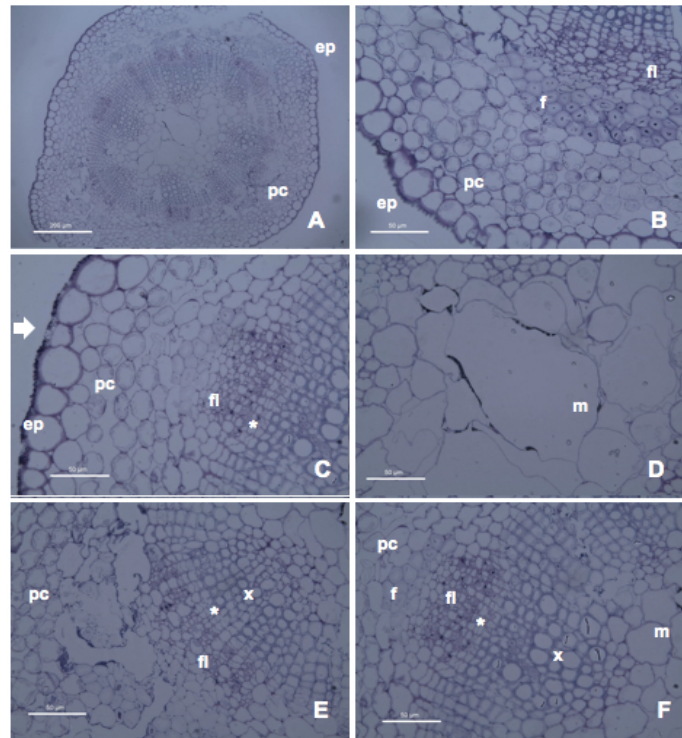


Figura 28: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-F, detalles. Asterisco (\*): cambium; ep: epidermis; f: fibras;; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B-F=50  $\mu$ m.

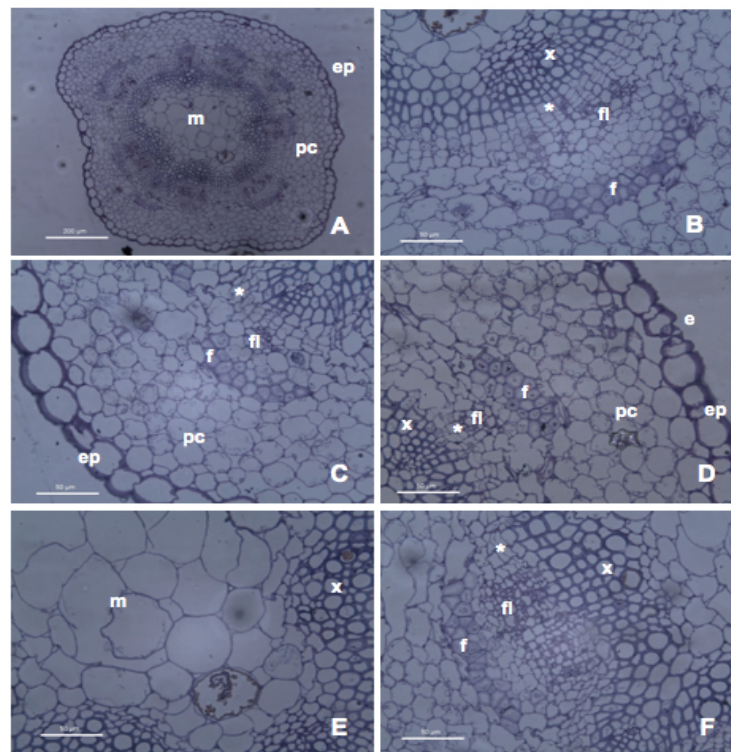


Figura 29: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-F, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras;; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B-F=50  $\mu$ m.

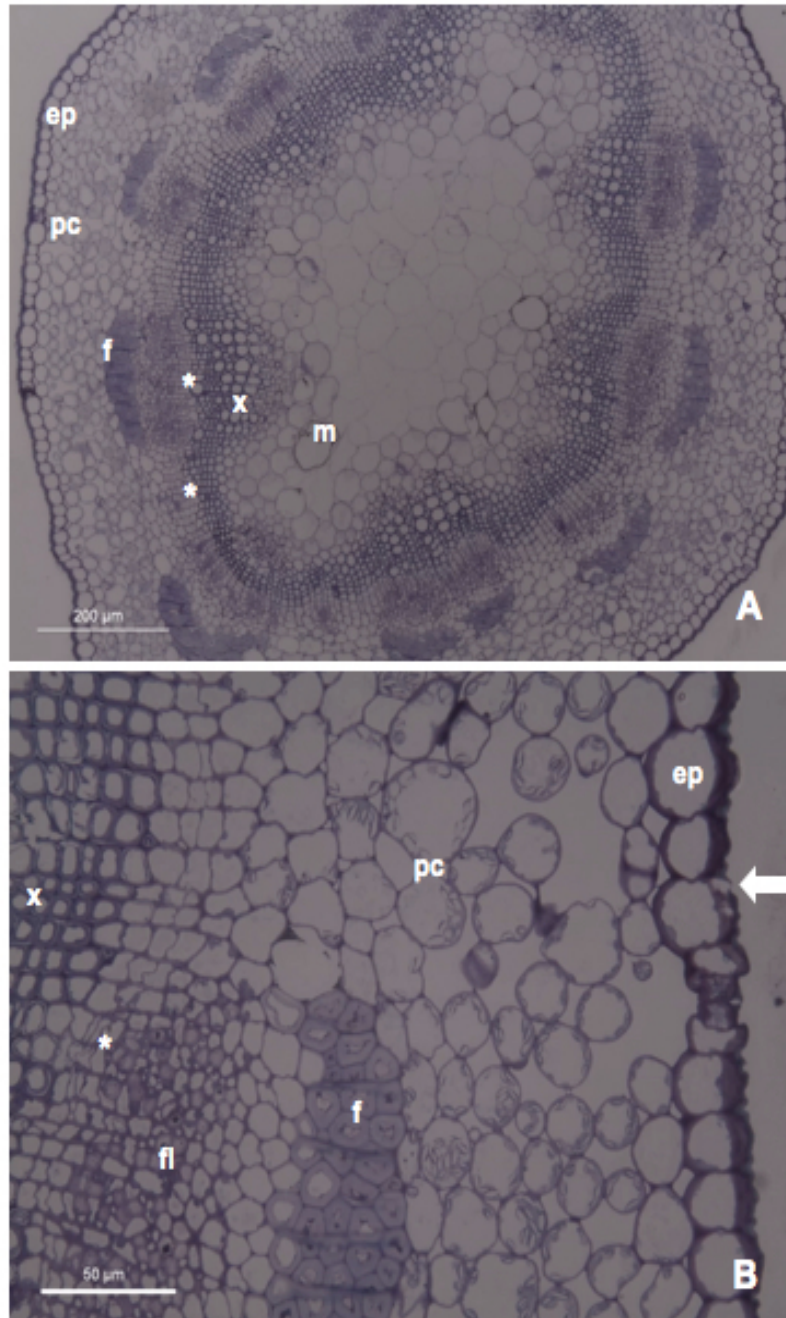


Figura 30: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Tallo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B, detalle. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras,; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A= 200  $\mu$ m; B= 50  $\mu$ m.

**TESTIGO SUSCEPTIBLE (TS):** El tallo primario corresponde a una eustela con 8-9 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario. La epidermis es uniestratificada presenta células epidérmicas voluminosas oblongas a redondeadas, con la pared tangencial externa más engrosada que la pared tangencial interna y la cutícula estriada. Los estomas se ven superficiales. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico que consta de 5-7 capas de células más o menos isodiamétricas a oblongas y con los cloroplastos en posición parietal.

Se observa floema secundario y en la periferia paquetes de fibras protofloemáticas con paredes engrosadas que toman la coloración con azul de toluidina, el contorno de las fibras es poligonal y el lumen visible. El xilema secundario presenta elementos de conducción, parenquima (axial y radial) y fibras con las paredes visiblemente engrosadas. La médula presenta células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro. En posición central en ocasiones se observa un espacio intercelular esquizógeno de forma irregular (Figura 31 A-D).

**DOSIS 1 SUSCEPTIBLE (D1S):** El tallo primario corresponde a una eustela con 8-9 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario. La epidermis se presenta uniestratificada, con células epidérmicas voluminosas oblongas a redondeadas, con la cutícula estriada y la pared tangencial externa más engrosada que la pared tangencial interna. Los estomas se ven superficiales y con repliegues cuticulares conspicuos. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico que consta de 5-7 capas de células más o menos isodiamétricas a irregulares y con los cloroplastos conspicuos y en posición parietal.

Se observa floema secundario y en la periferia paquetes de fibras protofloemáticas con paredes engrosadas que toman la coloración con azul de toluidina, el contorno de las fibras es poligonal y el lumen visible. El xilema secundario presenta elementos de



conducción, parénquima (axial y radial) y fibras con las paredes visiblemente engrosadas. La médula es sólida y presenta células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro (Figura 32 A-B y Figura 33 A-D).

**DOSIS 2 SUSCEPTIBLE (D2S):** El tallo primario corresponde a una eustela con 8-9 haces vasculares colaterales. La sección documentada presenta crecimiento secundario. La epidermis es uniestratificada, con células epidérmicas voluminosas oblongas a redondeadas, con la cutícula estriada y la pared tangencial externa más engrosada que la pared tangencial interna. Los estomas se ven hundidos y con repliegues cuticulares conspicuos. El parénquima cortical consiste en un clorénquima subepidérmico que consta de 5-7 capas de células oblongas y con los cloroplastos en posición parietal.

Se observa floema secundario y en la periferia paquetes de fibras protofloemáticas con paredes algo engrosadas que toman ligeramente la coloración con azul de toluidina, el contorno de las fibras es poligonal y el lumen visible. El xilema secundario presenta elementos de conducción, parénquima (axial y radial) y fibras con las paredes visiblemente engrosadas. La médula exhibe células parenquimáticas, pequeñas en la periferia y más grandes hacia el centro (Figura 34 A-D).

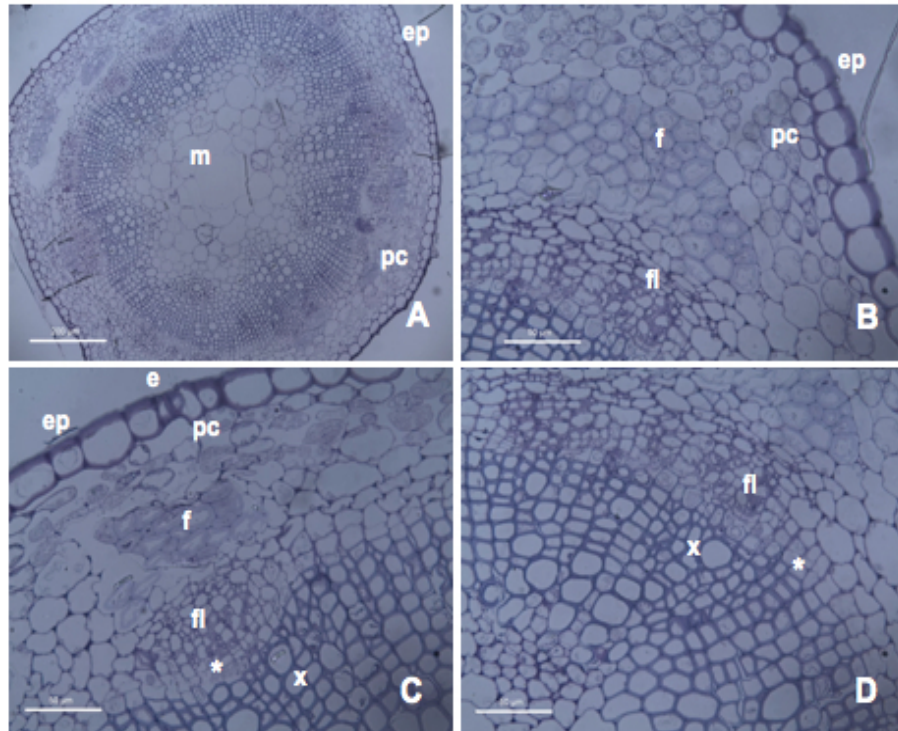


Figura 31: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Tallo Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A= 200  $\mu$ m; B-D= 50  $\mu$ m.

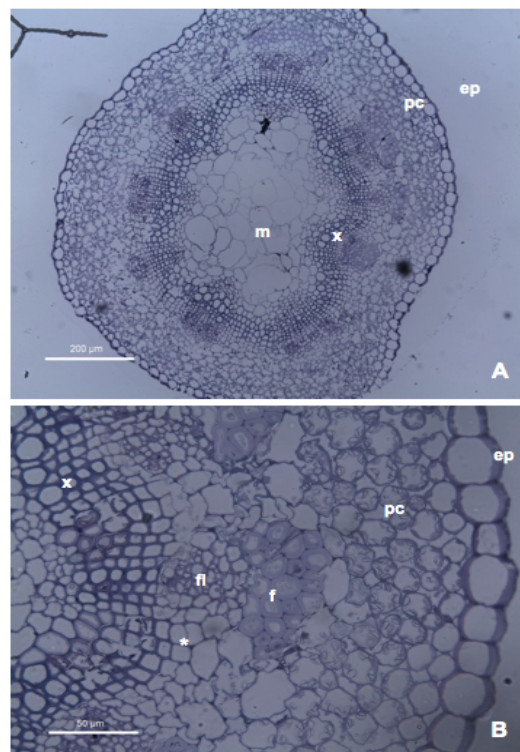


Figura 32: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. L. glaber) Experimento 2012. Tallo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B, detalle. Asterisco (\*): cambium ep: epidermis; f: fibras; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema. Escalas A=200  $\mu$ m; B=50  $\mu$ m.

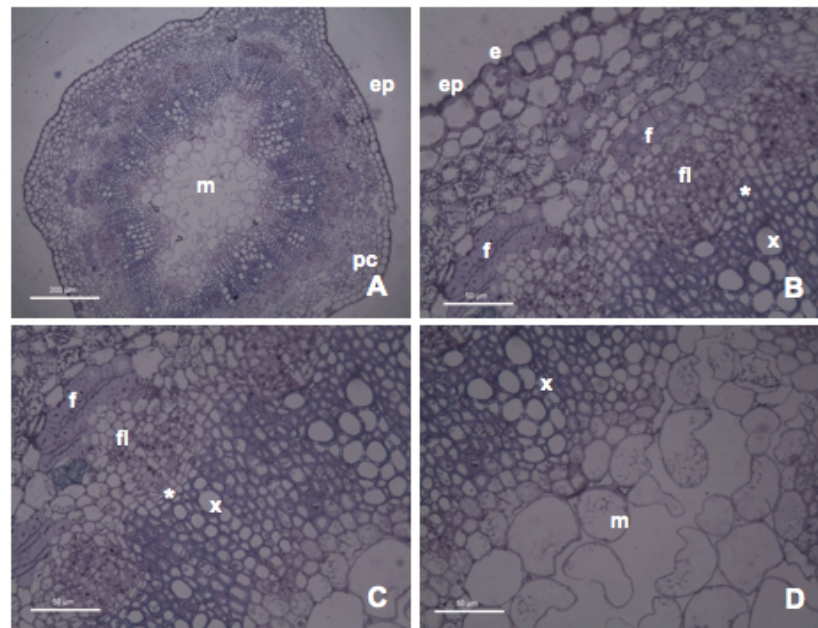


Figura 33: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2013. Tallo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalle. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

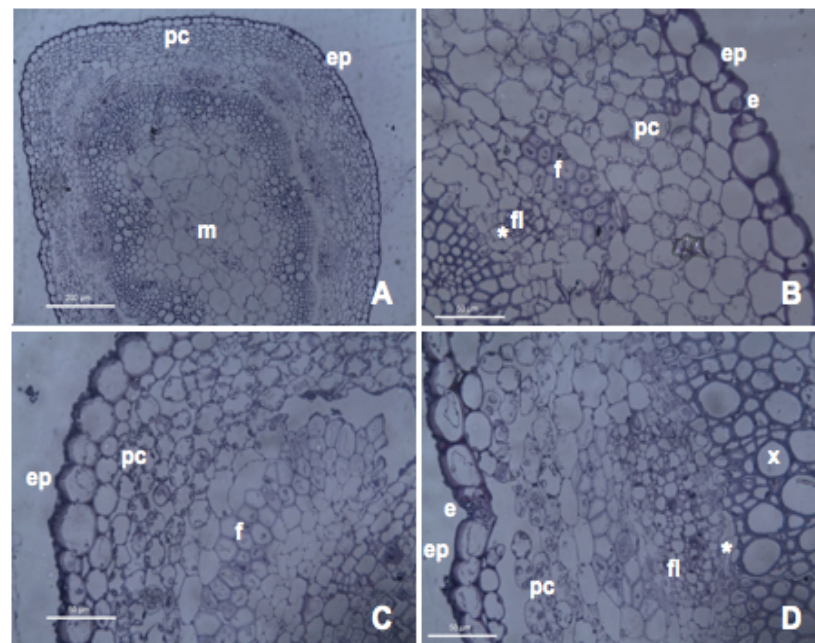


Figura 34: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Tallo Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. Asterisco (\*): cambium; e: estoma; ep: epidermis; f: fibras; fl: floema; m: médula; pc: parénquima cortical; x: xilema Escalas A=200  $\mu$ m; B-D=50  $\mu$ m.

### **3.4.2.a.2 Observaciones de los folíolos en corte transversal**

**TESTIGO TOLERANTE (TT):** Las epidermis adaxial y abaxial se presentan uniestratificadas y con las células distendidas. Los estomas están presentes en ambas epidermis y se observan ligeramente hundidos. El mesófilo presenta simetría dorsiventral. El clorénquima en empalizada está constituido por 2-3 capas de células. El clorénquima esponjoso, presenta células irregulares que dejan entre sí espacios intercelulares conspicuos. Los haces vasculares son colaterales, numerosos y de diferente calibre, se observan en sección transversal y longitudinal (Figura 35 A-C; Figura 36 A-B).

**DOSIS 1 TOLERANTE (D1T):** Las epidermis adaxial y abaxial se presentan uniestratificadas. La epidermis adaxial exhibe las células epidérmicas más grandes que las abaxiales. Los estomas están presentes en ambas epidermis y se observan ligeramente hundidos. El mesófilo se observa laxo con gran cantidad de espacios intercelulares, presenta simetría dorsiventral. El clorénquima en empalizada está constituido por 2-3 capas de células. El clorénquima esponjoso, presenta células irregulares que dejan entre sí espacios intercelulares conspicuos. Los haces vasculares son colaterales, numerosos y de diferente calibre, se observan en sección transversal y longitudinal. Respecto del control, en el tejido xilemático, los elementos de conducción, fibras y parénquima presentan las paredes más engrosadas (Figura 37 A-C; Figura 38 A-B).

**DOSIS 2 TOLERANTE (D2T):** Las epidermis adaxial y abaxial se presentan uniestratificadas. La epidermis abaxial exhibe las células epidérmicas más grandes que las adaxiales. Los estomas están presentes en ambas epidermis y respecto del control, se observan ligeramente más hundidos.

El mesófilo presenta simetría dorsiventral y exhibe un incremento en el número de capas de células de clorénquima. El clorénquima en empalizada está constituido por 6-8 capas de células. El clorénquima esponjoso presenta células más voluminosas respecto del



control y ligeramente irregulares, dejan entre sí espacios intercelulares algo más reducidos. Los cloroplastos en general son numerosos, en posición parietal y respecto del control, exhiben mayor tamaño. Los haces vasculares son colaterales, numerosos y de diferente calibre, se observan en su mayoría en sección transversal (Figura 39 A-E).

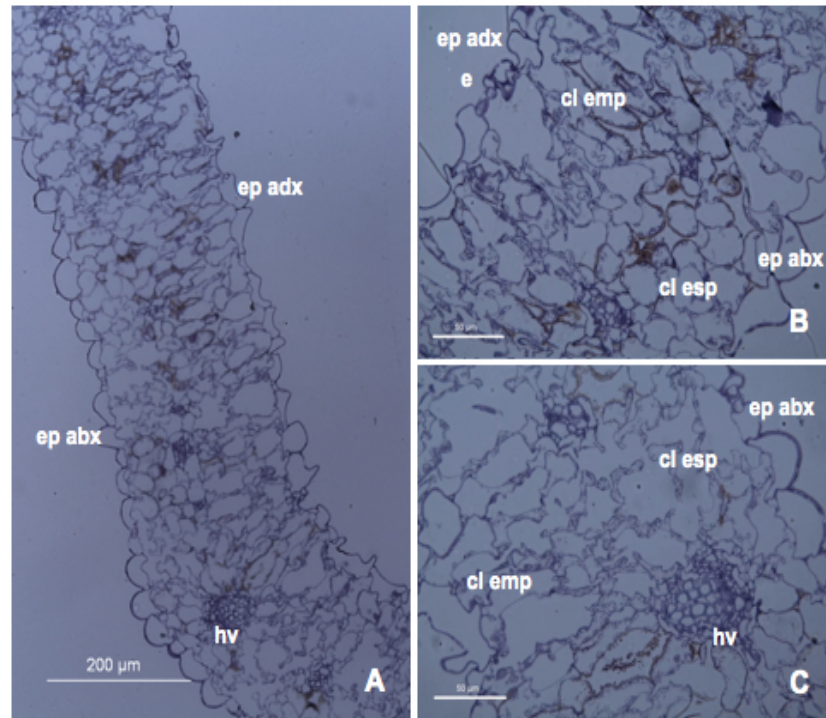


Figura 35: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Folíolo Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A=200 µm; B-C=50 µm.

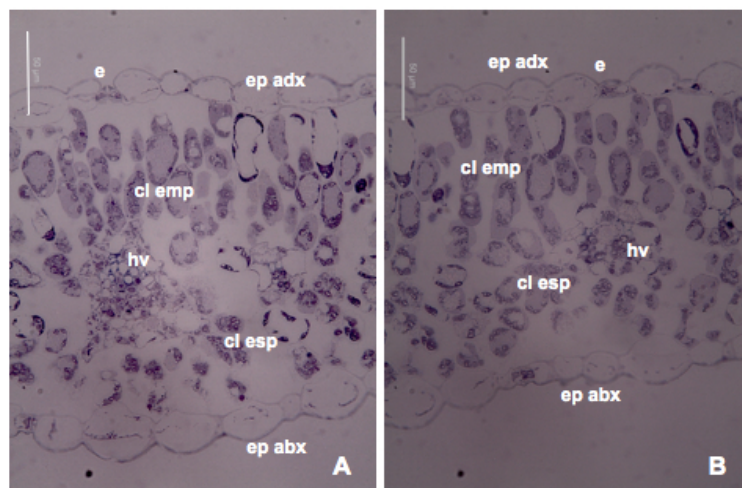


Figura 36: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2013. Hoja Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A-B=50 µm.

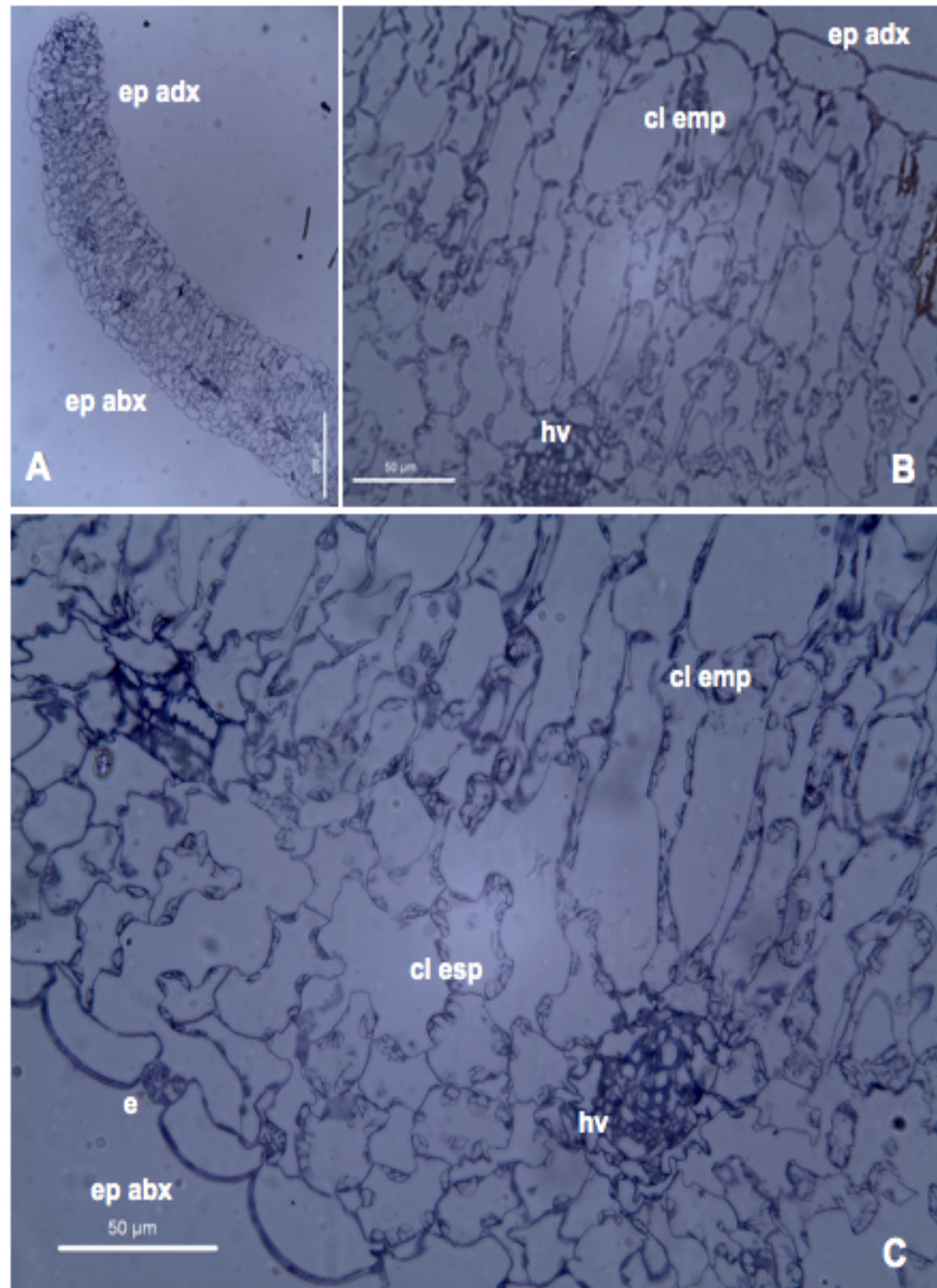


Figura 37: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Folíolo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A=200 μm; B-C=50 μm.



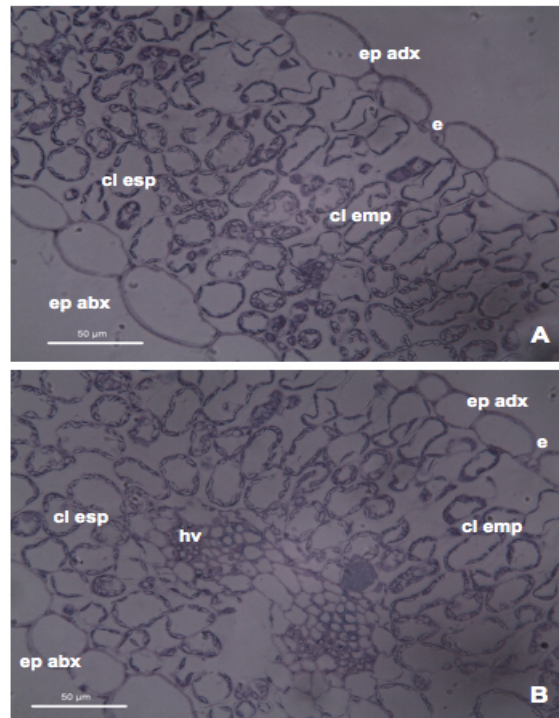


Figura 38: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Folíolo Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO. A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas= 50 µm.

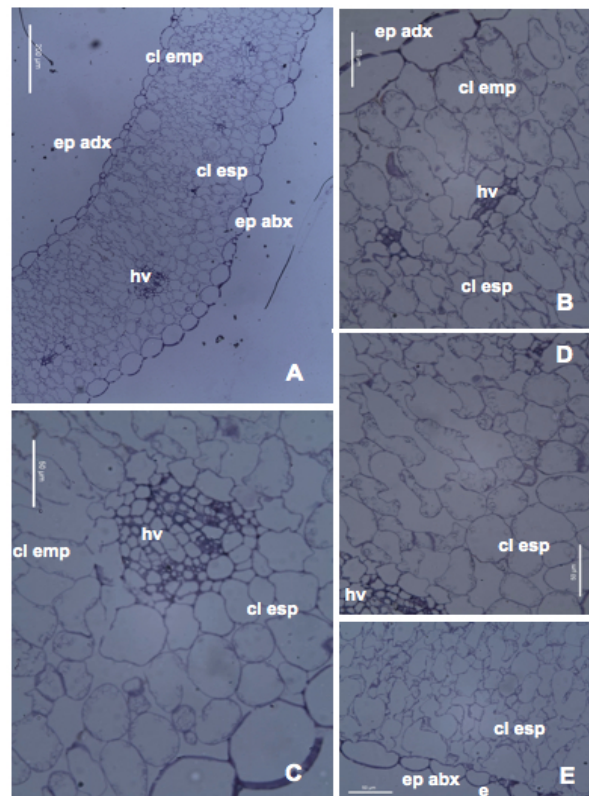


Figura 39: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Folíolo Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200 µm; B-E=50 µm.

**TESTIGO SUSCEPTIBLE (TS):** Las epidermis adaxial y abaxial se presentan uniestratificadas. La epidermis abaxial exhibe células de tamaño ligeramente mayor que las adaxiales. Los estomas están presentes en ambas epidermis y se observan hundidos. El mesófilo presenta simetría dorsiventral. El clorénquima en empalizada está constituido por 2-3 capas de células. El clorénquima esponjoso, presenta células irregulares que dejan entre sí espacios intercelulares conspicuos. Las células del mesófilo muestran abundantes cloroplastos, conspicuamente delimitados y en posición parietal. Los haces vasculares son colaterales, numerosos y de diferente calibre, se observan en su mayoría en sección transversal. Respecto del control tolerante, todas las paredes celulares se observan más engrosadas. (Figura 40 A-B).

**DOSIS 1 SUSCEPTIBLE (D1S):** Las epidermis adaxial y abaxial se observan uniestratificadas. La epidermis abaxial exhibe las células epidérmicas ligeramente de mayor tamaño que las adaxiales. Los estomas están presentes en ambas epidermis y se observan hundidos. El mesófilo presenta simetría dorsiventral. El clorénquima en empalizada está constituido por 4-7 capas de células. El clorénquima esponjoso, presenta células irregulares que dejan entre sí espacios intercelulares. Las células del mesófilo poseen abundantes cloroplastos discoides, conspicuamente delimitados y en posición parietal. Los haces vasculares son colaterales, numerosos y de diferente calibre, se observan en sección transversal. Respecto del control susceptible todas las paredes celulares se encuentran más engrosadas (Figura 41 A-C; Figura 42 A-B).

**DOSIS 2 SUSCEPTIBLE (D2S):** Las epidermis adaxial y abaxial son uniestratificadas. La epidermis abaxial exhibe las células epidérmicas de mayor tamaño que las adaxiales. Los estomas están presentes en ambas epidermis y se observan hundidos. El mesófilo presenta simetría dorsiventral. El clorénquima en empalizada está constituido por 2-3



capas de células. El clorénquima esponjoso, presenta células irregulares que dejan entre sí espacios intercelulares. Las células del mesófilo poseen abundantes cloroplastos discoides, bien delimitados y en posición parietal. Los haces vasculares en su mayoría en sección transversal, son colaterales, numerosos y de diferente calibre. Todas las paredes celulares más engrosadas que el TS (Figura 43 A-D).

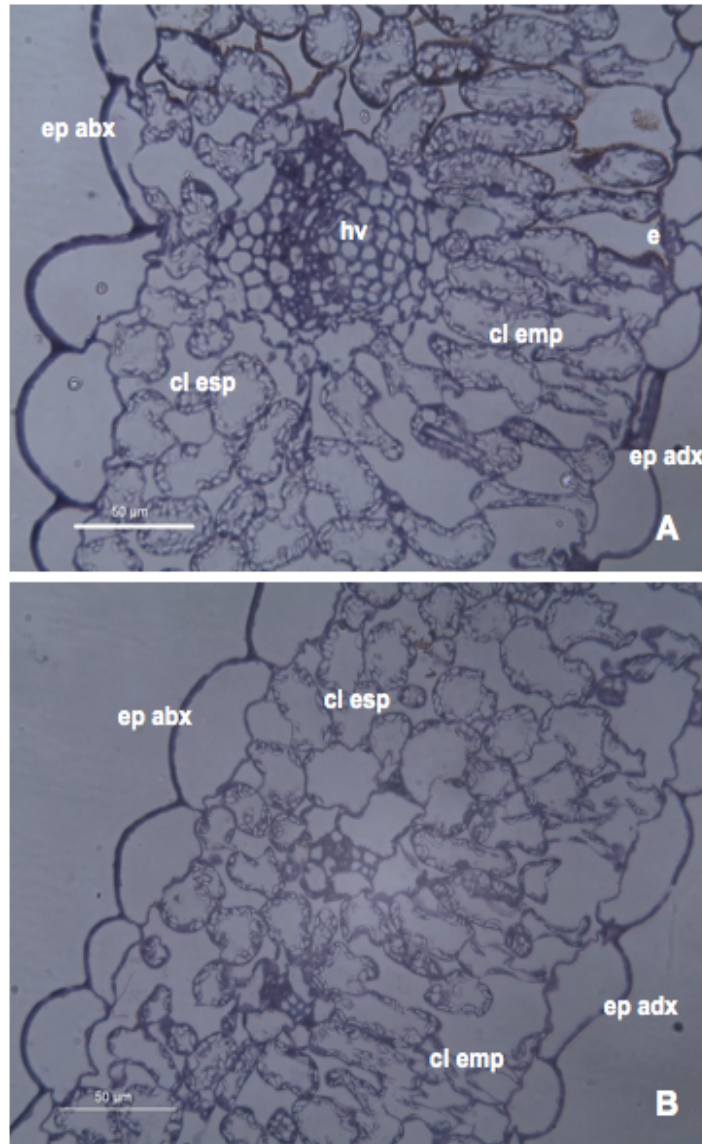


Figura 40: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Foliolo Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas=50 µm.

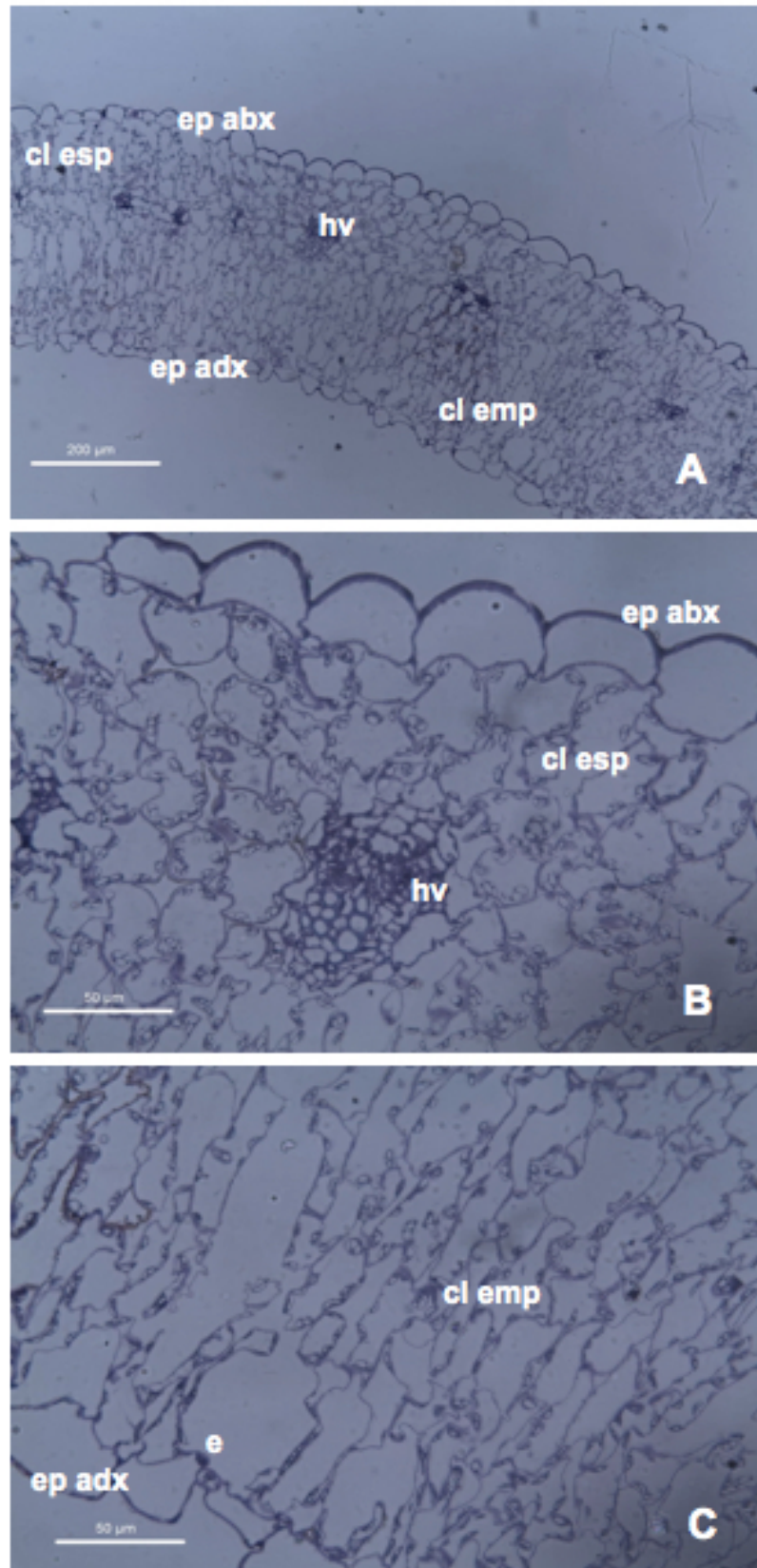


Figura 41: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Foliolo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200 µm; B-C=50 µm.

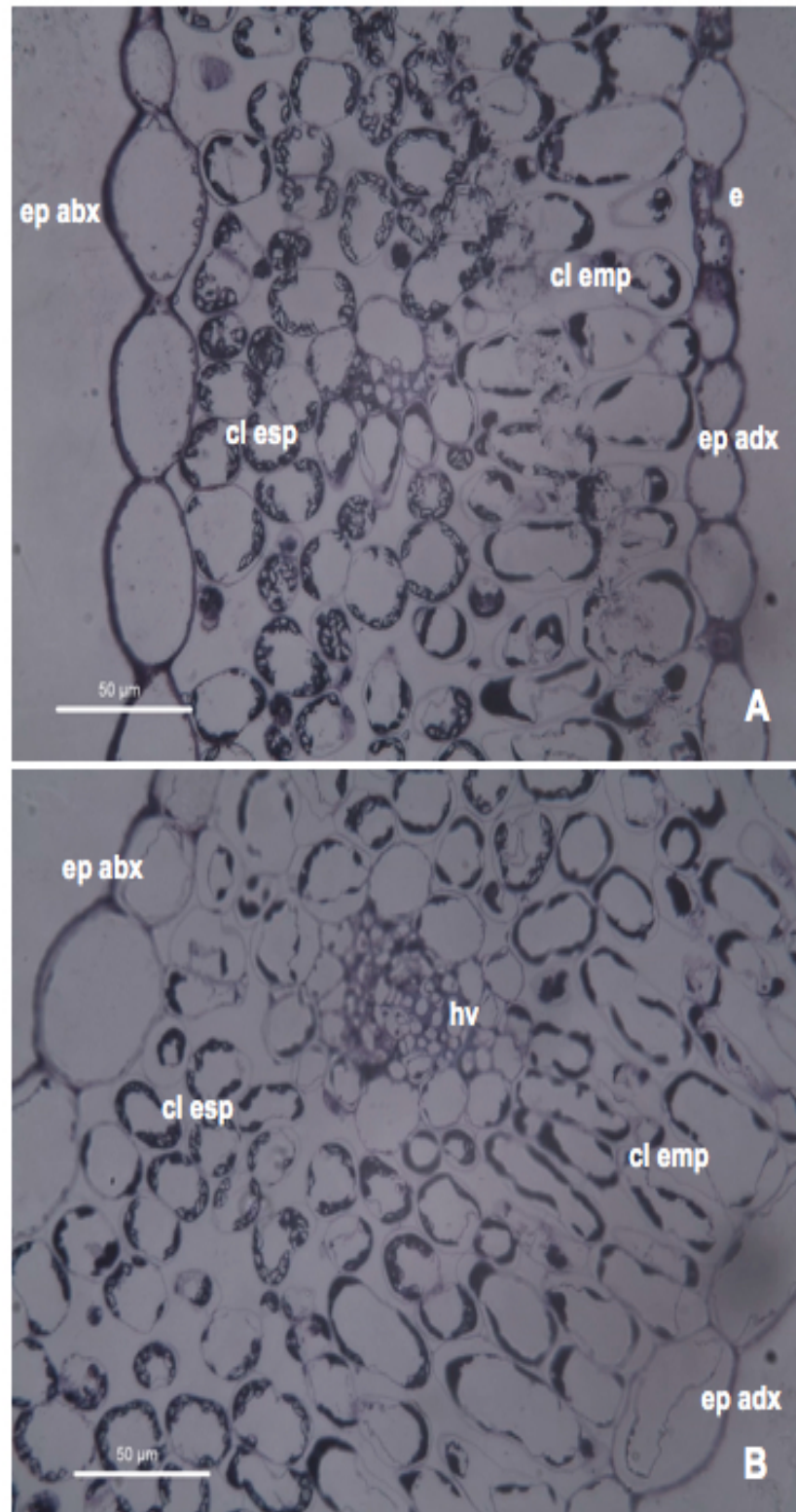


Figura 42: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013 Folíolo Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas=50 µm.



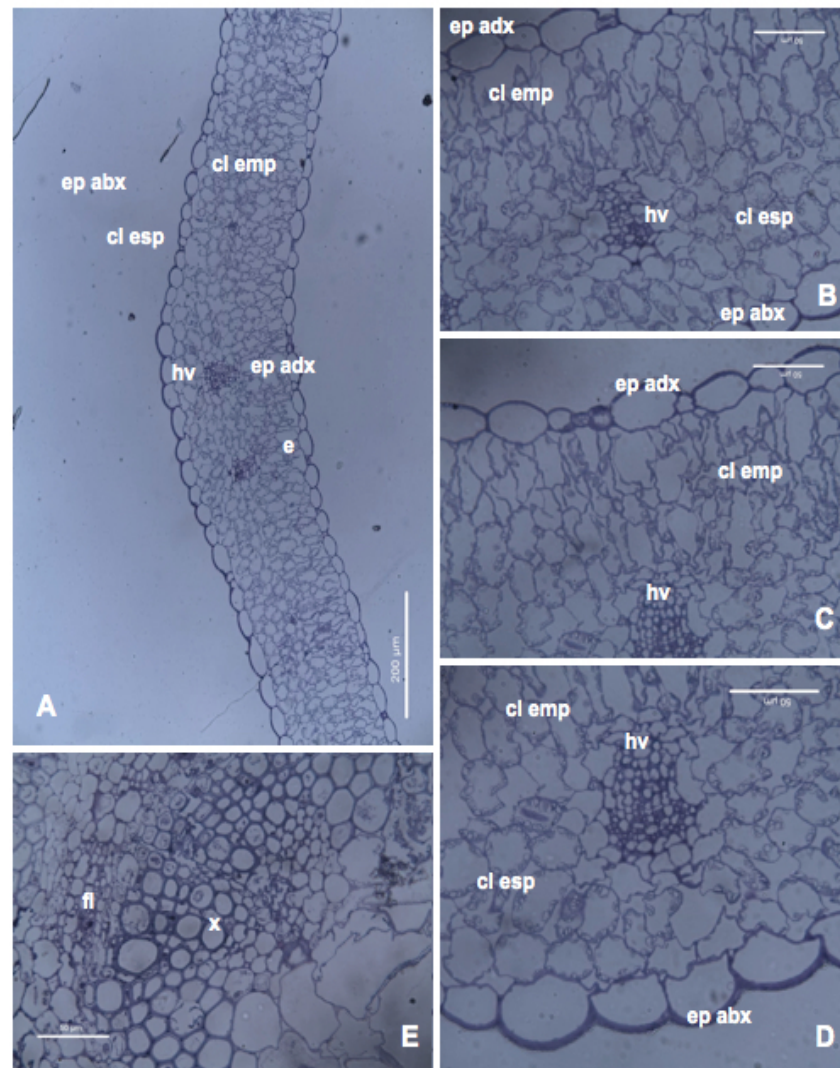


Figura 43: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Folíolo Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. cl emp: clorénquima en; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; fl: floema; hv: haz vascular; x: xilema. Escalas A=200 µm; B-E=50 µm.

### 3.4.2.a.3 Observaciones de las raíces en corte transversal

**TESTIGO TOLERANTE (TT):** La estructura del xilema primario es pentarca a hexarca. La sección exhibe forma circular y presenta crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los elementos de vaso, se ven solitarios o agrupados. Cuando agrupados, en racimos, en series tangenciales de 2 o 3 elementos y/o en series radiales cortas. El parénquima axial es paratraqueal, cuando difuso, escaso. Los radios son 2-4 seriados y presentan trayecto rectilíneo. Las fibras son abundantes, poseen contorno poligonal, pared engrosada y

lumen reducido. El cambium, formado por células radiales y fusiformes, es angosto. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, parénquima (axial y radial) y fibras. Estas últimas se agrupan en paquetes reducidos y presentan la pared engrosada. El felógeno que se diferencia en la periferia del floema secundario activo genera peridermis delgadas. Entre dos peridermis sucesivas se observan restos de tejidos muertos. (Figura 44 A-D; Figura 45 A-B).

**DOSIS 1 TOLERANTE (D1T):** La estructura del xilema primario es pentarca a hexarca. La sección exhibe crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los elementos de vaso se observan solitarios o agrupados, cuando agrupados en racimos, en series radiales y/o tangenciales cortas. El parénquima axial es paratraqueal y/o difuso. Los radios son angostos 1-2 seriados y anchos 8-9 seriados. Se constata en el parénquima (axial y radial) la presencia de abundante almidón. Los elementos de vasos, fibras y parénquima exhiben las paredes celulares más engrosadas respecto del control, en particular los elementos de vaso se ven con el diámetro algo reducido. El cambium está formado por células radiales y fusiformes y se observa bien delimitado y se documentan hasta 10-12 células de espesor en la zona cambial. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, parénquima axial, parénquima radial y fibras. Estas últimas con la pared engrosada, se agrupan en paquetes reducidos. El parénquima floemático exhibe abundante cantidad de almidón. En la periferia del floema secundario activo se ve una peridermis delgadas. Entre dos peridermis sucesivas se observan restos de tejidos muertos. (Figura 46 A-B; Figura 47 A-E).

**DOSIS 2 TOLERANTE (D2T):** La estructura del xilema primario es pentarca a hexarca. La sección de contorno circular presenta crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los

elementos de vaso se observan solitarios o agrupados. Cuando agrupados en racimos, series tangenciales de 3-4 elementos y/o en series radiales largas. El parénquima axial es paratraqueal, a difuso. Los radios son anchos 2-6 seriados y presentan trayecto rectilíneo. Se documenta abundante cantidad de almidón en el parénquima radial. Las fibras abundantes, con contorno poligonal y lumen visiblemente reducido tienen la pared notablemente engrosada respecto del control. El cambium, integrado por células radiales y fusiformes, está claramente demarcado. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, parénquima (axial y radial) y fibras. Estas últimas, con la pared conspicuamente engrosadas, se agrupan en paquetes. El parénquima floemático con abundante cantidad de almidón. En la periferia del floema secundario activo se ve una peridermis delgada. (Figura 48 A-E; Figura 49 A-D).

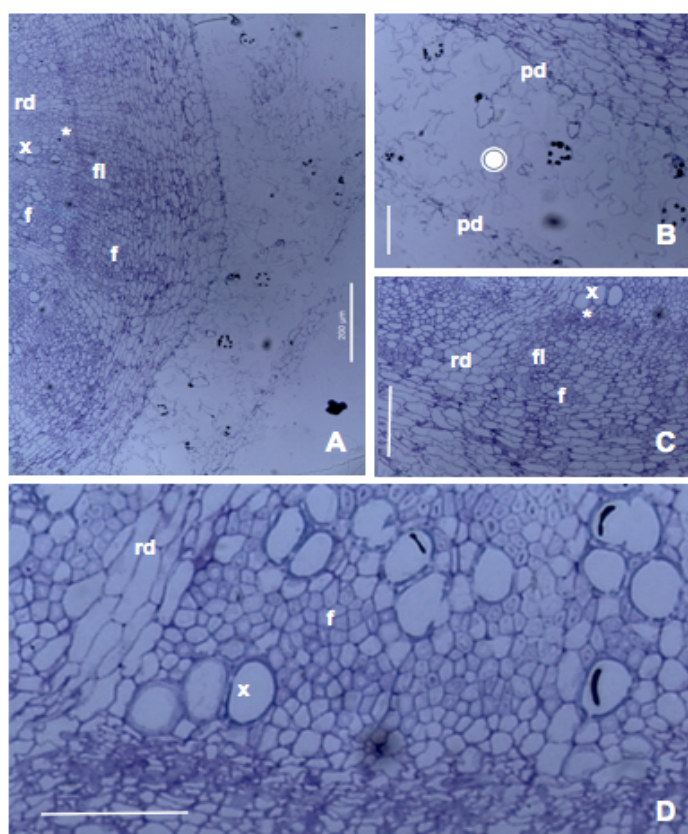


Figura 44: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D: detalles. Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200 μm, B: 75 μm; C: 130 μm; D=80 μm.



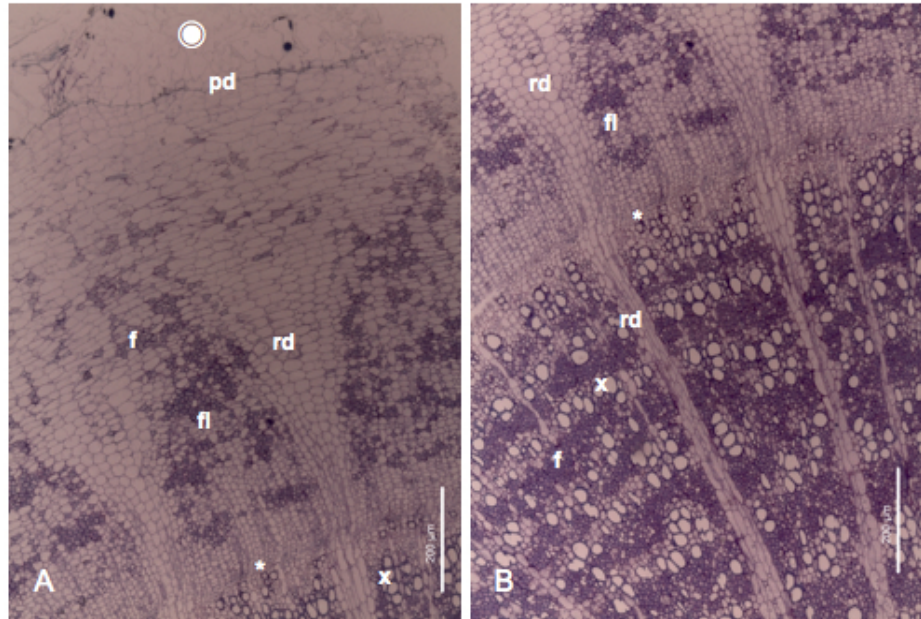


Figura 45: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Testigo Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis rd: radio; ●: tejido muerto; x: xilema secundario. Escalas A-B=50 µm.

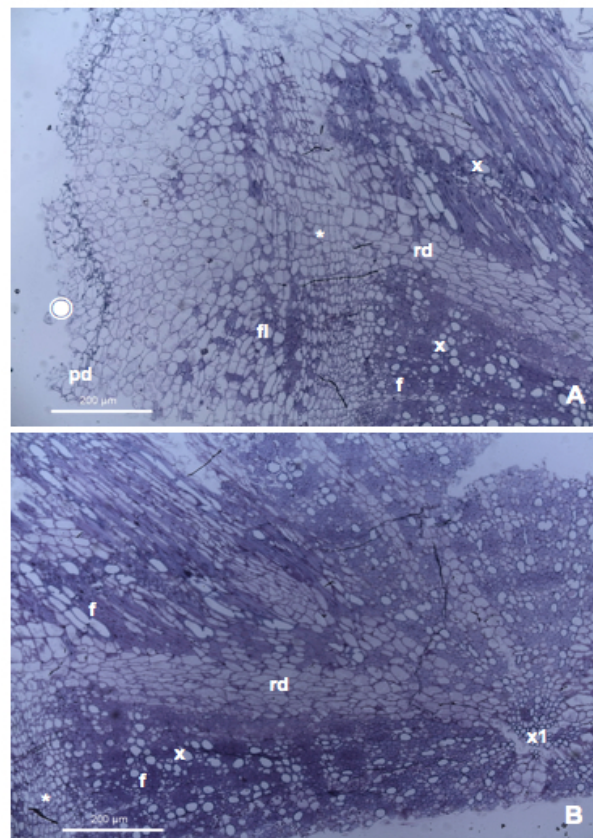


Figura 46: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-B=200 µm.

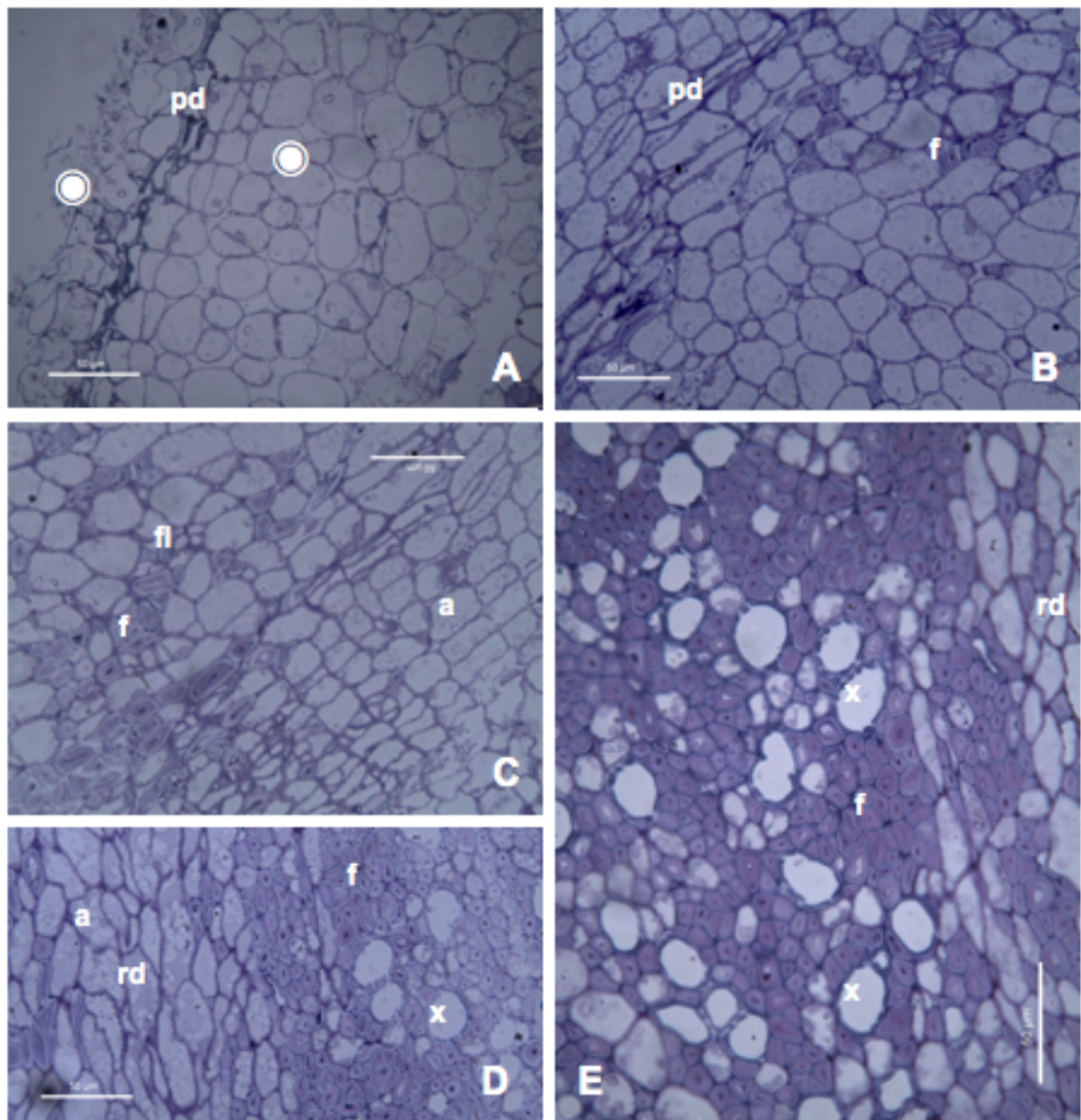


Figura 47: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-E, detalles. a: almidón Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio secundario; x: xilema; x1: xilema primario. Escalas A=200  $\mu$ m; B-E=50  $\mu$ m.



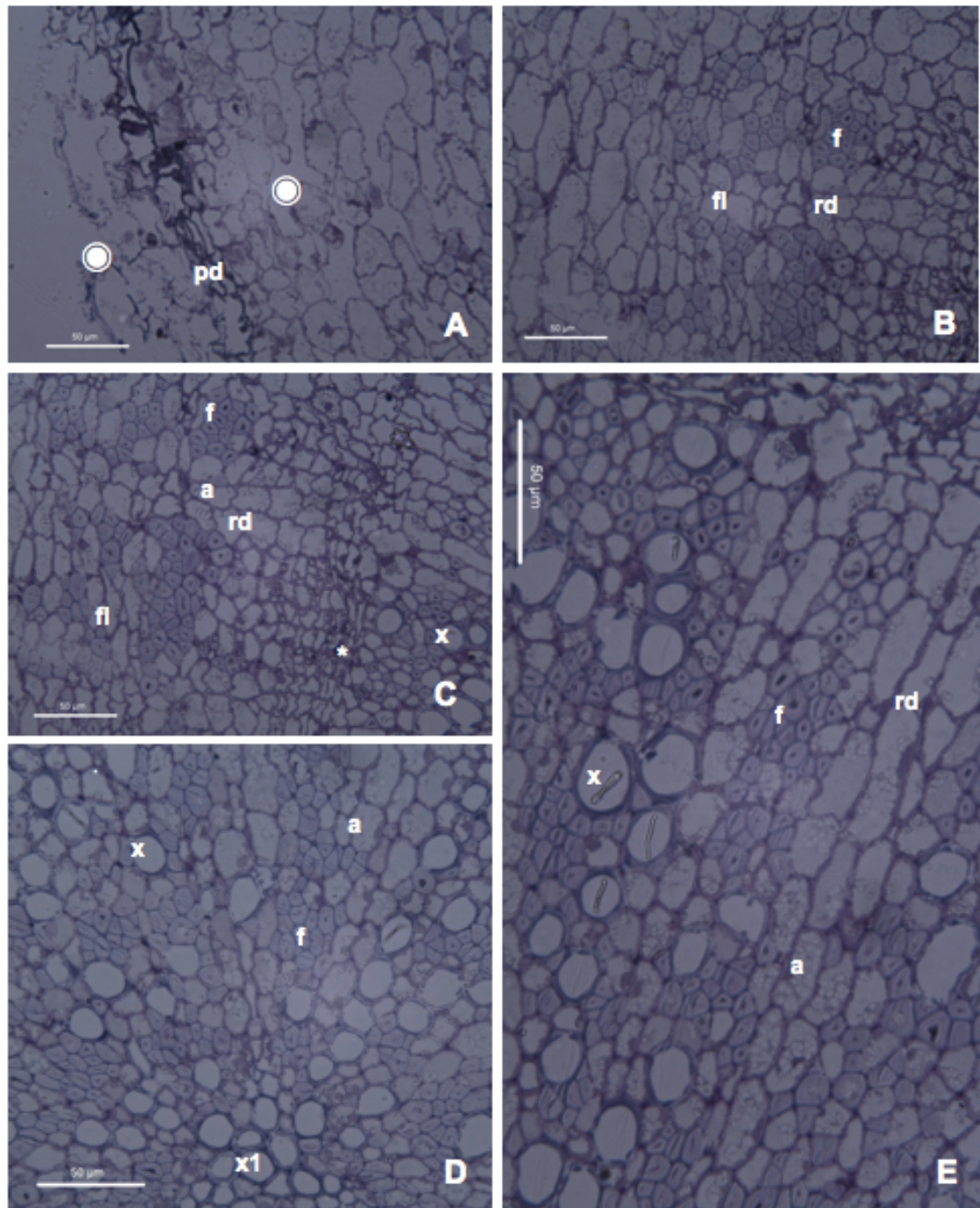


Figura 48: A-E, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2012. Raíz Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-E, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-E=50 µm.

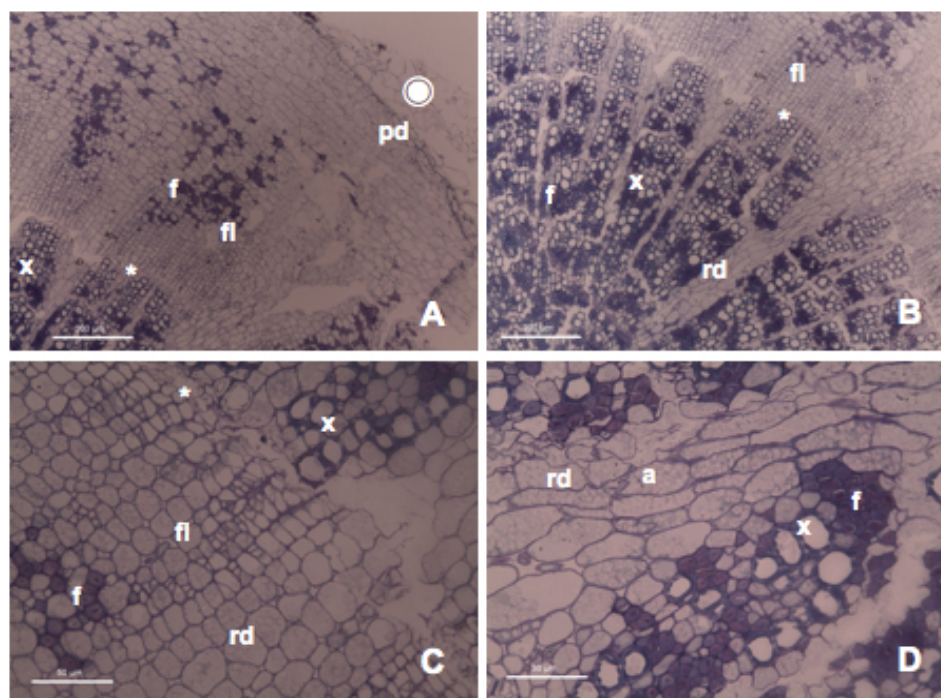


Figura 49: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2013. Raíz Dosis 2 Tolerante (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; C-D, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ⊙: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario; x1: xilema primario. Escalas A-B=200  $\mu$ m; C-D=50  $\mu$ m.

**TESTIGO SUSCEPTIBLE (TS):** La sección de contorno circular presenta crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los elementos de vaso ocasionalmente solitarios se observan en su mayoría agrupados en racimos, en series tangenciales de 2 o 3 elementos y/o en series radiales cortas. El parénquima axial es paratraqueal y cuando difuso, escaso. Los radios son anchos, 2-12 seriados y presentan trayecto rectilíneo. El parénquima presenta abundante almidón. Las fibras abundantes, con contorno poligonal y lumen reducido, tienen la pared visiblemente engrosada que se tiñe de azul violáceo con la coloración de azul de toluidina. El cambium bien demarcado e integrado por células iniciales radiales y fusiformes conforma una zona angosta. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, parénquima (axial y radial) y fibras. Estas últimas, con la pared engrosada, se tiñen intensamente de violáceo con la coloración de azul de toluidina. En todo el parénquima floemático se ve abundante almidón. En la periferia del

floema secundario activo, se documentan peridermis delgadas. Entre dos peridermis sucesivas se observan restos de tejidos muertos cuyas células dejan entre sí abundantes espacios intercelulares irregulares. Todas las paredes de las células se observan visiblemente engrosadas. (Figura 46 A-D; Figura 47 A-B).

**DOSIS 1 SUSCEPTIBLE (D1S):** La sección presenta crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los elementos de vaso, ocasionalmente solitarios se observan en su mayoría agrupados en racimos, en series tangenciales de 2 o 3 elementos y/o en series radiales cortas. El parénquima axial es apotraqueal y paratraqueal. Los radios son uniseriados a pluriseriados anchos y presentan trayecto rectilíneo. El parénquima presenta abundante almidón. Las fibras numerosas con contorno poligonal y lumen reducido tienen la pared visiblemente engrosada que se tiñe de azul violáceo intenso con la coloración de azul de toluidina. La zona cambial claramente delimitada e integrada por células iniciales y fusiformes es angosta. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, parénquima (axial y radial) y fibras. Estas últimas, con la pared engrosada, toman intensamente la coloración violácea con azul de toluidina. Todo el parénquima floemático axial y radial con abundante almidón. En la periferia del floema secundario activo se documenta la presencia de peridermis delgadas. Entre dos peridermis sucesivas se observan restos de parénquima muerto cuyas células dejan entre sí abundantes espacios intercelulares irregulares. Todas las paredes de las células se observan visiblemente engrosadas respecto del testigo y aun más respecto a la dosis 2 (Figura 48 A-C; Figura 49 A-F).

**DOSIS 2 SUSCEPTIBLE (D2S):** La sección presenta crecimiento secundario. El xilema secundario está compuesto por elementos de vasos, parénquima (axial y radial) y fibras. Los elementos de vaso ocasionalmente solitarios se observan en su mayoría agrupados en



racimos, en series tangenciales y/o en series radiales cortas. El parénquima axial es paratraqueal y apotraqueal. Los radios son uniseriados y pluriseriados y presentan trayecto rectilíneo. El parénquima contiene abundante almidón. Las fibras dispuestas en paquetes y/o en bandas anastomosadas son más abundantes respecto del TS. Presentan contorno poligonal, lumen reducido y pared visiblemente engrosada que se tiñe de azul violáceo intenso con la coloración azul de toluidina. El cambium bien delimitado e integrado por células iniciales y fusiformes conforma una zona angosta. El floema secundario funcional exhibe elementos cribosos, células acompañantes, abundante parénquima (axial y radial) y escasas fibras. Estas últimas, con la pared engrosada, toman intensamente la coloración violácea con azul de toluidina. Todo el parénquima floemático con abundante almidón. Todas las paredes de las células se observan visiblemente engrosadas. En la periferia del floema secundario activo se documenta una vista parcial de una delgada peridermis (Figura 50 A-D).

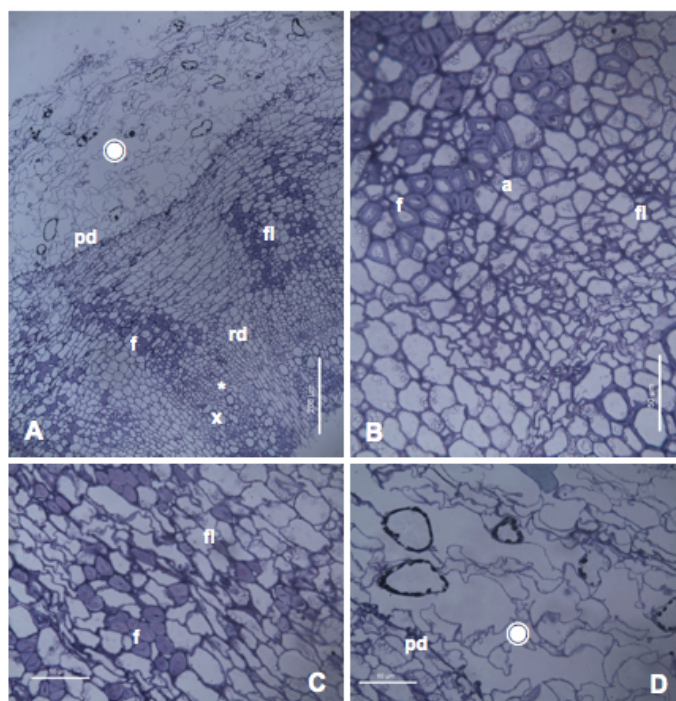


Figura 50: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ●: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A= 200µm B-D=50 µm.

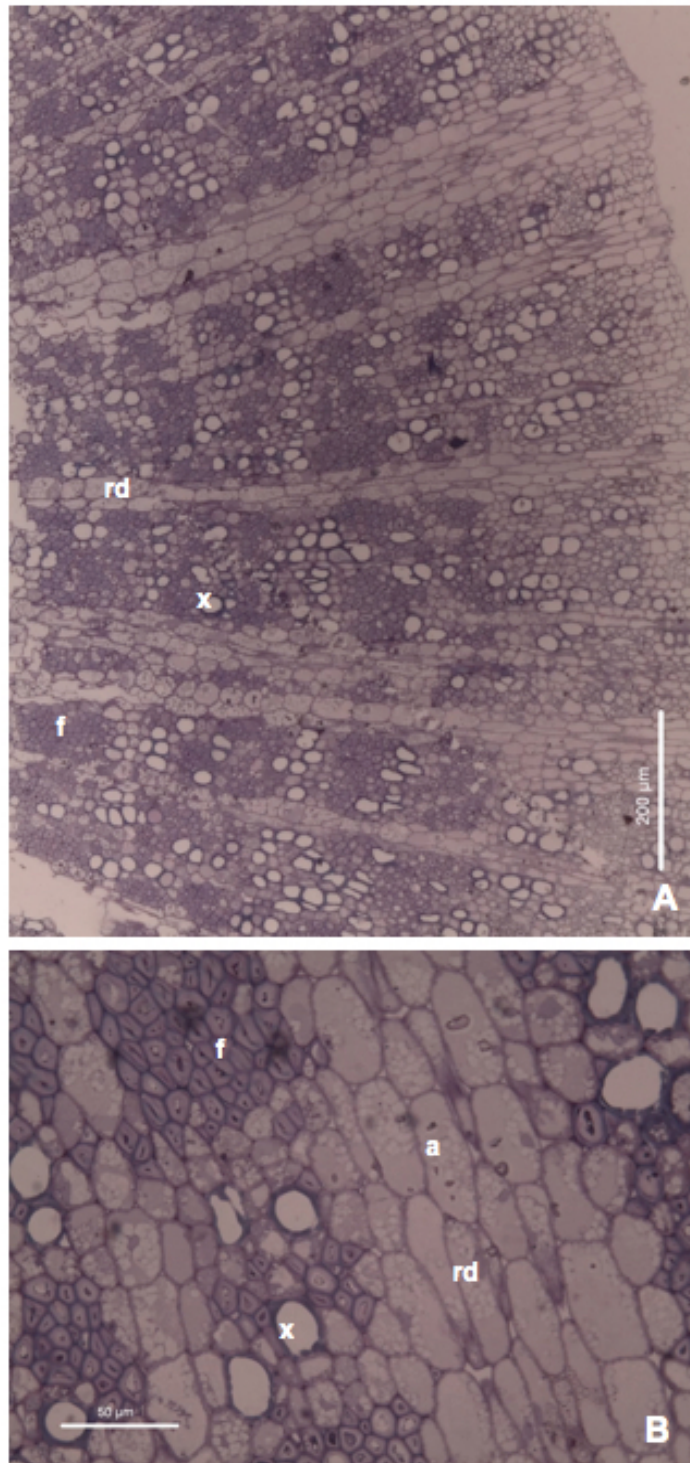


Figura 51: A-B, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2013. Raíz Testigo Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, detalles. a: alimidón; f: fibras; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A-B=50  $\mu$ m.



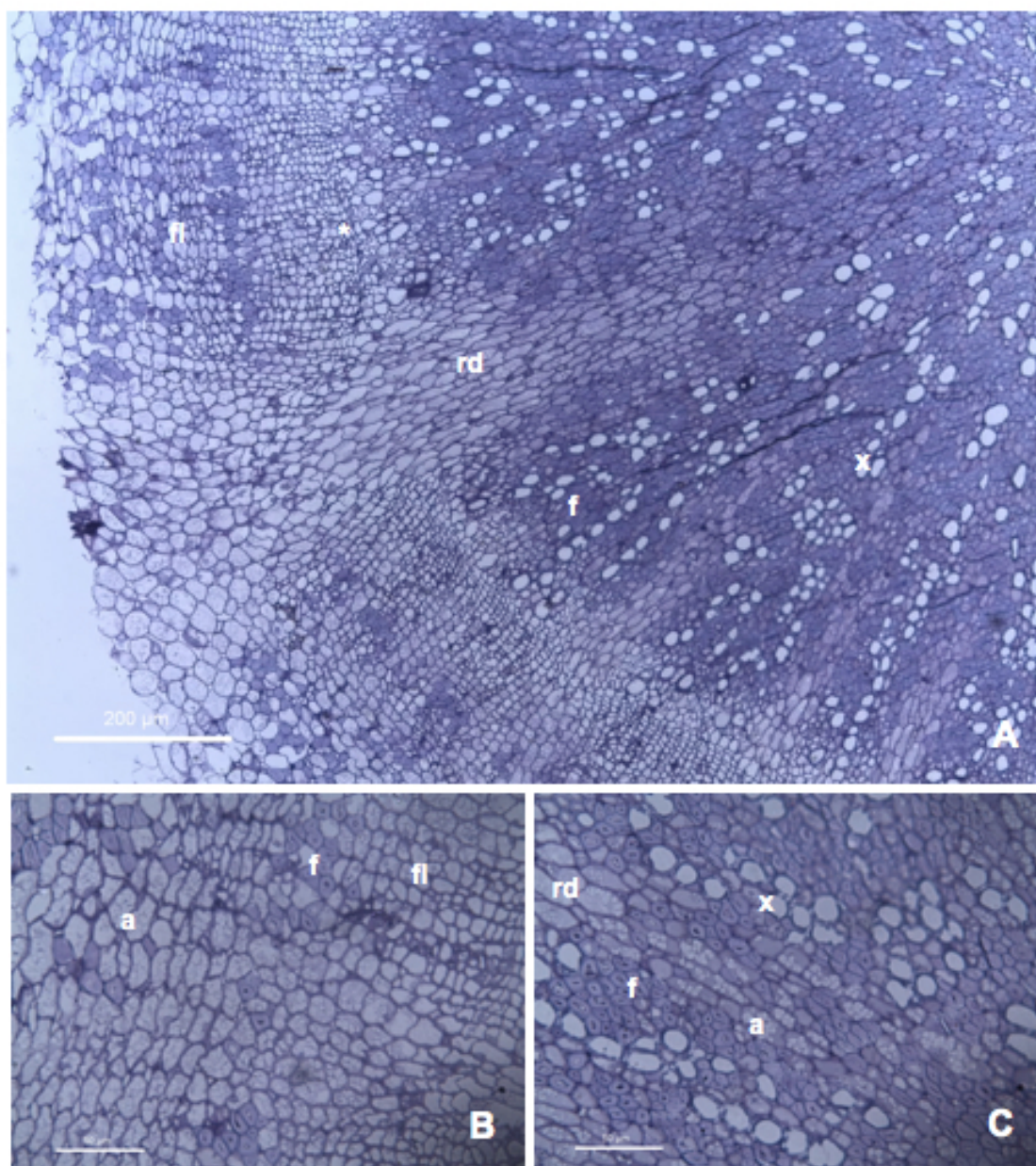


Figura 52: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn.L. glaber) Experimento 2012. Raíz Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. a: alimdón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200  $\mu$ m; B-C=50  $\mu$ m.

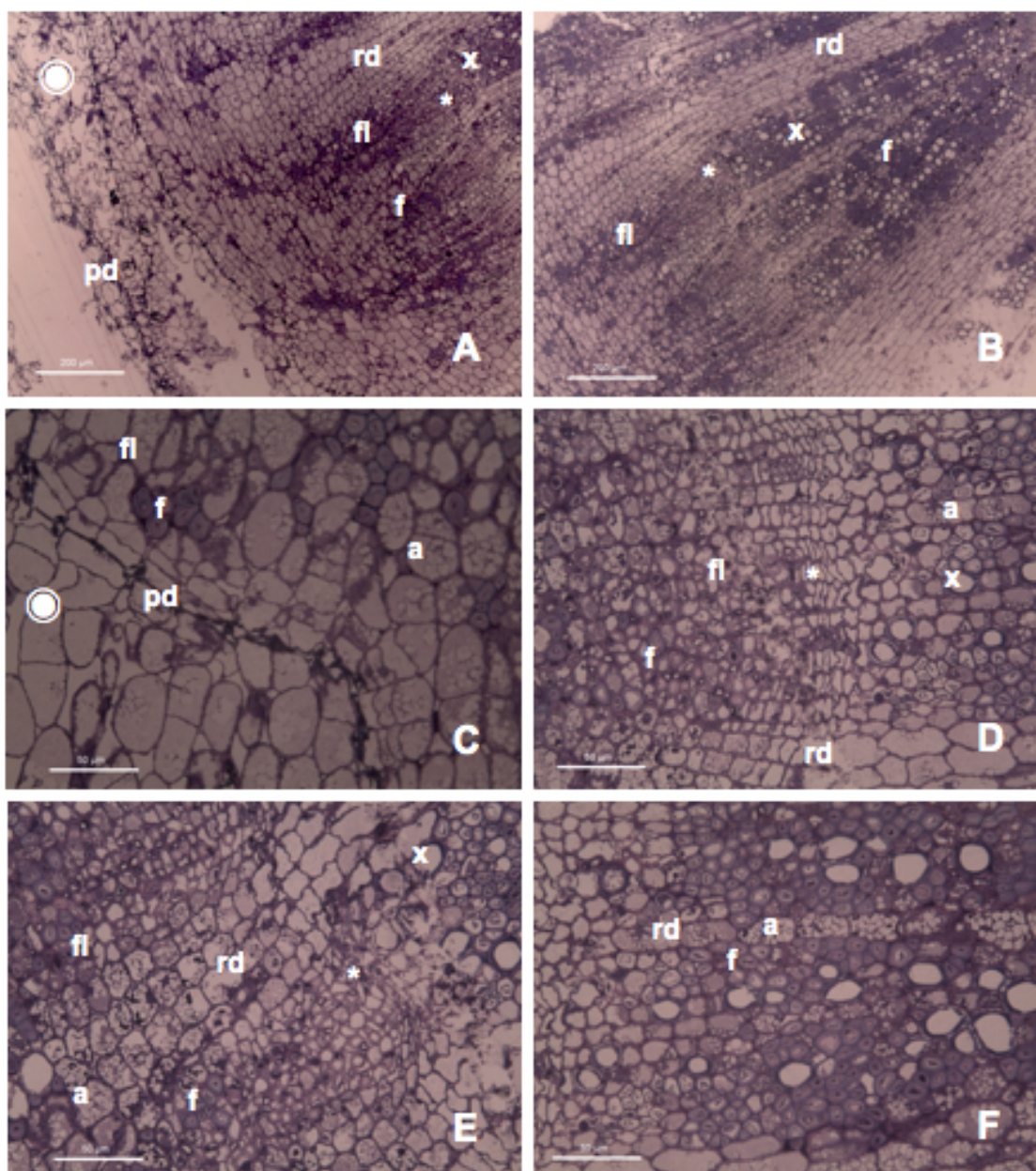


Figura 53: A-F, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2013. Raíz Dosis 1 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A-B, aspecto general; C-F, detalles. a: almidón; Asterisco (\*): cambium; f: fibras; fl: floema secundario; pd: peridermis; ⊙: tejido muerto; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A-B=200 μm; C-F=50 μm.



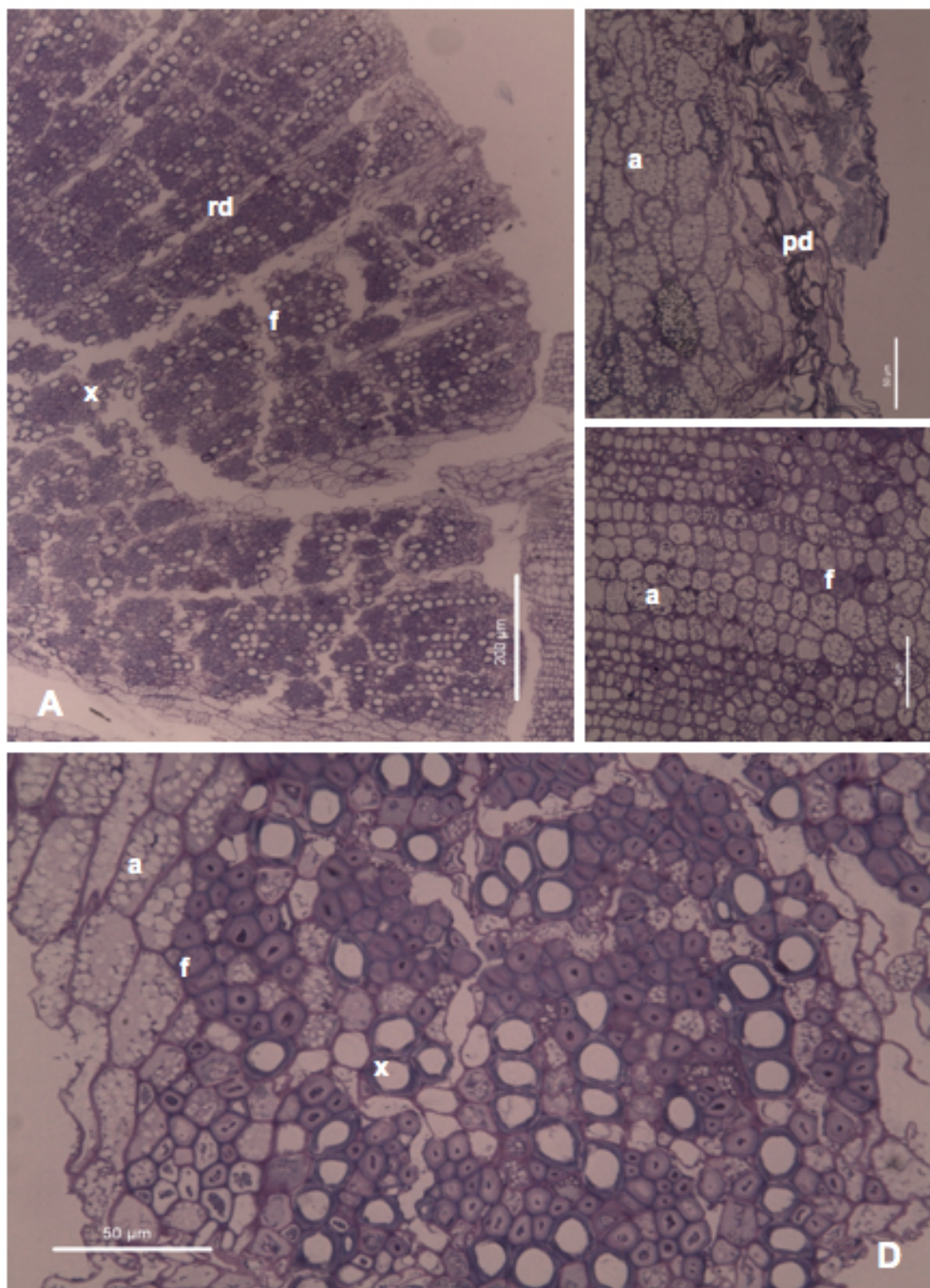


Figura 54: A-D, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Experimento 2013. Raíz Dosis 2 Susceptible (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-D, detalles. a: almidón; f: fibras; pd: peridermis; rd: radio; x: xilema secundario. Escalas A=200 μm; B-D=50 μm.



### **3.4.2.b Estrés biótico producido por trips**

#### **3.4.2.b.1 Exomorfología y observaciones con microscopía óptica (MO)**

La observación de cortes transversales de folíolos con microscopía óptica revela aplastamiento tangencial de las células epidérmicas atacadas. Asimismo, en las células del mesófilo, en los espacios intercelulares e incluso en algunas células epidérmicas se observaron secreciones en forma de gotas oleosas que toman la coloración naranja, Asimismo, en posición subepidérmica adaxial, en el mesofilo en empalizada se documentó una visible alteración de las células (Figura 55 A-D). En las células del mesofilo esponjoso, los cambios registrados fueron mas atenuados. Las alteraciones consistieron en la presencia de células distendidas, colapsadas, vacías, rotas. Es interesante mencionar la ausencia de cloroplastos en algunas células afectadas, conjuntamente con presencia de cloroplastos parcialmente colapsados en otras (Figura 55 A-C). En algunos cortes histológicos se constató, en áreas circunscriptas, el colapso completo de la epidermis, (Figura 56 D, flecha). La observación magnificada de la pared tangencial externa de células epidérmicas adaxiales exhibió signos de destrucción parcial que se vieron como áreas translúcidas. Estas áreas se ubicaron intercaladas entre áreas no afectadas, intensamente teñidas con la coloración metacromáticas de azul de toluidina. Las áreas translúcidas documentadas estarían causadas por el efecto destructivo de la herbivoría (Figura 56 A-C flechas). Es interesante documentar el aspecto de la pared tangencial externa intacta en células epidérmicas que no han sido afectadas por trips, (Figura 56 B \*).

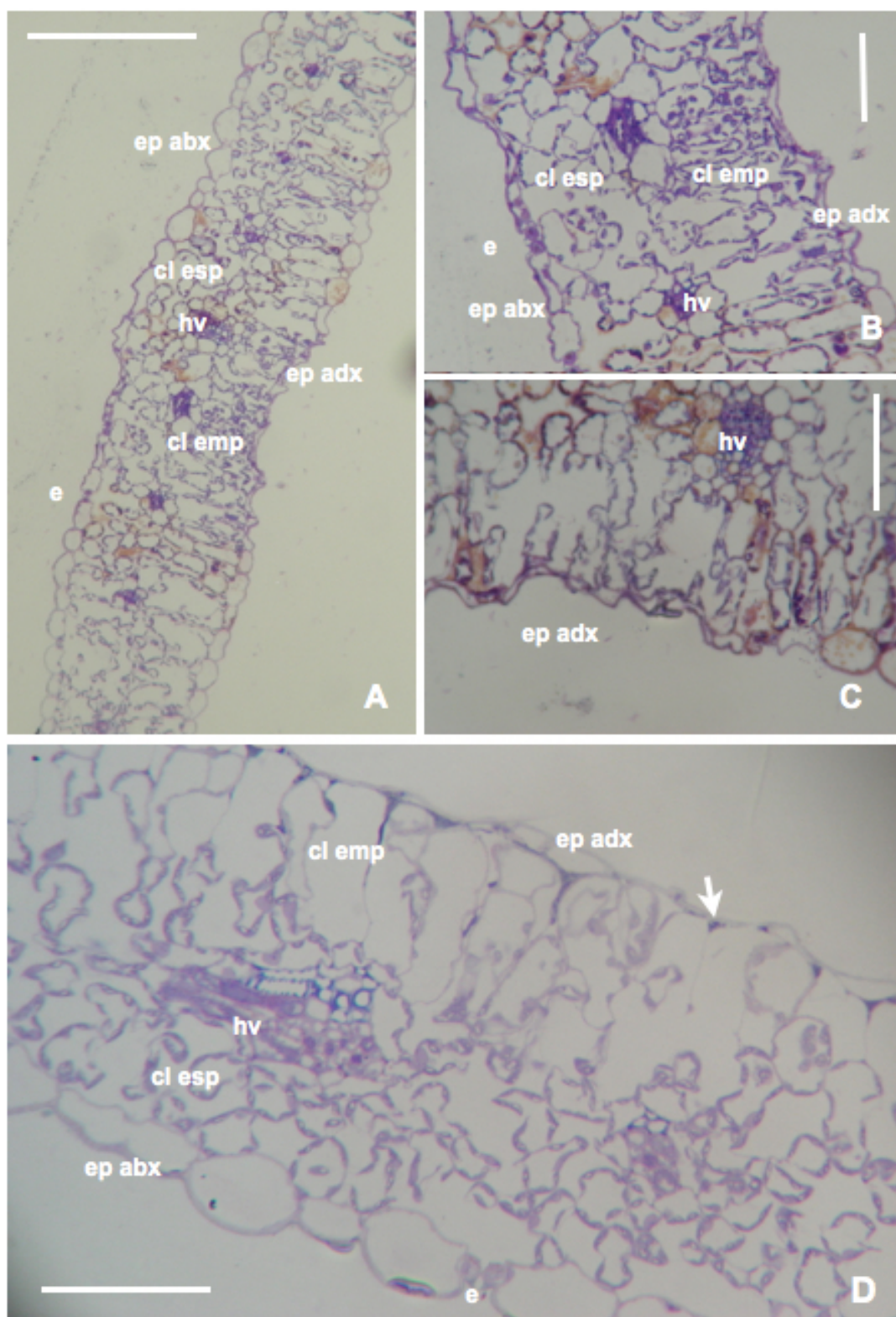


Figura 55: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) Ataque de trips. Experimento 2013. Folíolos (CT), fotomicrografías con MO: A-C: FMH 2241: A-B, aspectos generales; C, detalle; D, FMH 490 detalle. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular Escalas A=200; B= 50  $\mu$ m; C-D=75  $\mu$ m.

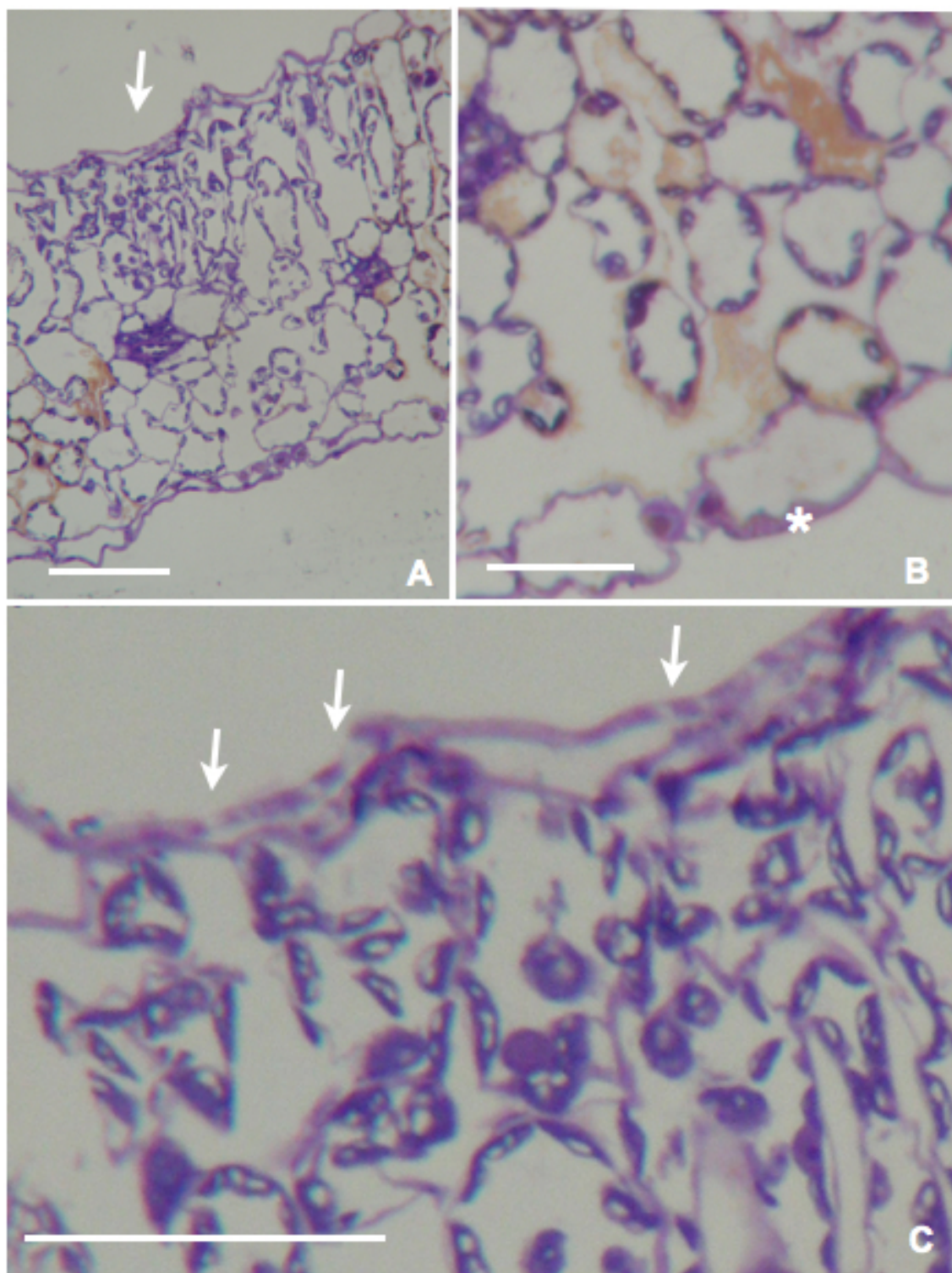


Figura 56: A-C, *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*). Ataque de trips. Experimento 2013. Foliolos (CT), fotomicrografías con MO: A, aspecto general; B-C, detalles. cl emp: clorénquima en empalizada; cl esp: clorénquima esponjoso; e: estoma; ep abx: epidermis abaxial; ep adx: epidermis adaxial; hv: haz vascular. Escalas A, C= 50  $\mu$ m; B= 25  $\mu$ m.

### 3.5 Discusión

#### 3.5.1 Consideraciones sobre parámetros de crecimiento, exomorfología y anatomía frente al estrés salino y a la herbivoría.

De acuerdo a Munns y Termaat (1986), Termaat y Munns (1986) y Munns y Gilliham (2015), la suma del efecto del estrés salino sobre las funciones bioquímicas y fisiológicas de las plantas resulta en una alteración en la tasa de crecimiento, la cual, a su vez, está fuertemente influenciada por el balance entre la fotosíntesis y la respiración. En experimentos publicados previamente, llevados a cabo a campo o realizados en el laboratorio, se encontró que la producción de biomasa disminuía a medida que aumentaba la intensidad del estrés salino (Teakle et al. 2006; Teakle et al. 2007; Pesqueira 2008; Escaray 2007; Teakle et al. 2010; Paz et al. 2014), en concordancia con los resultados encontrados en nuestros experimentos, aunque la variabilidad en la respuesta es alta. Pesqueira (2009) y Teakle et al. (2010) encontraron variabilidad entre poblaciones de *L. tenuis* en relación con la disminución del crecimiento provocado por la salinidad. De acuerdo a Munns et al. (2015), la ganancia total de energía de una planta disminuye frente a un aumento en el estrés salino, debido a una menor tasa fotosintética inducida por el cierre estomático, mayores costos energéticos de transporte, compartimentalización y exclusión de iones y detoxificación de ROS, influyendo en su crecimiento. También Dolbatadian et al. (2011) encontraron una disminución, tanto en la biomasa radicular, como en la materia seca radicular, producida a medida que se incrementaba el estrés salino en plantas de soja, obteniendo los menores valores a concentraciones de 100mM de NaCl, siendo este resultado similar a lo ocurrido en nuestros experimentos.

Existen antecedentes referidos en Byrta et al. (2018) que sugieren que frente al estrés salino, se produciría una reducción en el entrecruzamiento de las pectinas componentes de la pared celular, que afectaría la elongación celular, y esto contribuiría a

explicar el por qué de la reducción en largo de la raíz en suelos salinos. El entrecruzamiento de las pectinas, depende de los enlaces de  $\text{Ca}^{2+}$  a los residuos cargados negativamente (unidades de ácido galacturónico). Frente al estrés salino, el grado de entrecruzamiento de las moléculas de pectina depende de la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Esta relación sería fisiológicamente importante, ya que un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  desplazaría al  $\text{Ca}^{2+}$  en estos sitios de enlace, reduciendo el entrecruzamiento de pectinas y subsecuentemente la elongación celular. Esto contribuiría a explicar el por qué de la reducción en la elongación de la raíz en suelos salinos (Byrt et al. 2018).

En forma similar a lo reportado por Pesqueira (2009), Paz et al. (2014) y Dolbatadian et al. (2011), el número de tallos y ramificaciones por planta y su altura son variables de importancia, que se vieron afectadas también en nuestros experimentos en forma significativa, disminuyendo a medida que aumentó el estrés salino. El crecimiento de las tallos resultó más sensible a la salinidad que el crecimiento radicular (Teakle et al. 2006; Munns et al. 2008).

Esta disminución en el crecimiento de *Lotus tenuis* al tratarse de una especie forrajera en condiciones de alta salinidad, impacta negativamente a nivel productivo a campo, ya que frente al estrés salino, presenta una menor oferta forrajera que se observa por menor biomasa de tallos y hojas, menor número y longitud de tallos y ramificaciones disponibles para el pastoreo.

Los efectos de la salinidad descritos arriba se ven acompañados por una menor biomasa radicular y menor largo de raíces, que redundarían en una menor capacidad de la planta para explorar el perfil del suelo y para rebrotar.

Respecto al estrés biótico producido por trips, los mecanismos de defensa vegetales para contrarrestar el ataque de los herbívoros tienen un costo desde el punto de vista energético para el vegetal ya que deberán utilizar recursos que de otro modo se usarían

para el crecimiento y la reproducción. Si bien varios autores refieren la pérdida de rendimientos en cultivos comerciales de Fabáceas (arveja, lenteja, poroto, soja) o en cebolla, debidos al ataque de trips en sus hojas (Pobozniak 2011; Diaz-Montano et al. 2011), en este experimento no se encontraron diferencias en la biomasa producida en las plantas atacadas con respecto a los testigos ni en el porcentaje ni en los gramos de materia seca obtenida, pero sí se encontraron en las plantas atacadas zonas dañadas en las hojas adultas coincidentes con los síntomas de ataque de trips que se evidenciaban por puntos amarillentos y parches con áreas plateadas con pequeñas puntuaciones oscuras debidas a las excreciones de estos insectos (Gill et al. 2015; Boateng et al. 2014; Cranshaw 2014).

Pero la respuestas de las plantas sometidas a un estrés tanto biótico como abiótico no solamente afectan el crecimiento, sino que además ponen en funcionamiento mecanismos que pueden afectar la composición, estructura y comportamiento de sus paredes celulares, así como el contenido celular para minimizar los efectos de ese estrés, siendo este efecto modulado por las interacciones hormonales (cross talk), de acuerdo a lo explicado en la introducción y antecedentes (Byrt et al. 2018; Pesqueira 2009; Roy & Tester 2014; Sanchez et al. 2008, 2011). Para observar si se presentaban cambios a nivel de tejidos, se hicieron cortes transversales de tallos, hojas y raíces de las plantas testigo y de las regadas con las dos dosis de sal, de ambos experimentos del estrés salino, y se hicieron cortes transversales de hojas de las plantas testigo y atacadas del experimento de estrés biótico; que se observaron por microscopía óptica con el fin de visualizar si se producían cambios en la estructura de estos tejidos vegetales. Los mismos se tiñeron con azul de toluidina.



### **3.5.2 Consideraciones sobre los parámetros anatómico-estructurales respecto al estrés salino y biótico producido por trips.**

Desde el punto de vista anatómico-estructural, no se observaron diferencias entre los genotipos Tolerantes y Susceptibles pero sí respecto de los testigos, y en ambos experimentos frente al estrés salino, los cambios documentados fueron:

- 1- El incremento del número de capas de células del mesófilo de 2-3 capas a 2-6 capas que evidencia el aumento de espesor de los folíolos (hojas),
- 2- Aumento del grosor de la pared tangencial externa de las células epidérmicas en los folíolos, los tallos y las raíces,
- 3- Incremento del grosor de las paredes de los elementos de vaso y fibras en los folíolos, los tallos y las raíces,
- 4- Aumento del tamaño de los cloroplastos en el parénquima cortical de los tallos,
- 5- Incremento del tamaño de los cloroplastos en las células del mesófilo de los folíolos,
- 6- Abundante presencia de almidón en el tejido parenquimático de las raíces,
- 7- Estomas cerrados, en la epidermis de los tallos y de los folíolos.
- 8- Reducción del diámetro de los elementos de vaso en los tallos, los folíolos y las raíces,
- 9- Reducción en el diámetro de los tallos.

Paz et al. (2014) analizaron los cambios anatómico-estructurales de *L. tenuis* bajo condiciones de estrés salino (100 mM de NaCl) citando entre otros resultados un incremento en el grosor de la cutícula, reducción en la apertura de estomas y un incremento en el espesor de la hoja. Asimismo, Pesqueira (2009) con dosis de riego de 150 mM de NaCl, menciona el engrosamiento de los folíolos y reducción del tamaño celular y disminución en el diámetro de los tallos en las plantas estudiadas bajo las condiciones de estrés mencionadas. Al mismo tiempo, es interesante destacar que la autora no registró mortandad de plantas coincidiendo con nuestro experimento.

La reducción de la apertura de los estomas limitaría la asimilación de CO<sub>2</sub> y la pérdida de agua por transpiración. En consecuencia, el impacto en la tasa de fotosíntesis afectaría el crecimiento de la planta (Cabot et al. 2014).

La reducción en el diámetro de los elementos de vaso en tallos, folíolos y raíces podría ser interpretada como una respuesta adaptativa de las plantas de *L. tenuis* a las condiciones impuestas por el incremento de sal en el agua de riego (Paz et al. 2014) como ha sido probado en otros cultivos tales como *Phaseolus vulgaris* y *Panicum antidotale* (Cachorro et al. 1993; Navaz et al. 2013)

Los cambios estructurales detectados en el mesófilo (empalizada y esponjoso) de las hojas de plantas de *Lotus* creciendo en condiciones de estrés salino han sido citados, por ejemplo, en *Coffea arabica* L. y *Cucumis sativus* L. (Barbosa de Lima et al. 2014, Zhen et al. 2011). En particular, Zhen et al. (2011), encontró cambios estructurales significativos en los cloroplastos de plántulas de *Cucumis sativus* L. debidos al estrés salino. Al respecto, los autores sugieren que estos resultados se correlacionan con la dificultad de absorción de agua por las raíces de las plantas por el estrés osmótico debido al contenido de sal en el suelo disminuyendo el contenido de agua en las hojas.

Respecto a los solutos orgánicos, Fougere et al. (1991) sólo hacen referencia a un significativo incremento de hidratos de carbono totales de bajo peso molecular en raíces de *Medicago sativa* L., en particular destacan el notable incremento de sacarosa en las muestras analizadas. Pesqueira (2009), menciona una significativa disminución de almidón en los vástagos de plantas de *L. burtii* y *L. tenuis* Pampa INTA. Por el contrario en *L. tenuis* Chaja aumentó significativamente mientras que en el resto de las especies evaluadas no se detectaron diferencias entre los tratamientos. El presente estudio confirma un visible aumento de gránulos de almidón en el parénquima de las raíces de



plantas de *L. tenuis* creciendo bajo condiciones de estrés, sin encontrar hasta el presente citas que confirmen estas observaciones.

Debez et al (2004) reporta que uno de los mecanismos adoptados por *Cakile maritima* en su adaptación para soportar una concentración iónica interna muy alta debido al estrés salino, es la succulencia (dilución de los iones  $\text{Na}^+$ ), incrementando el grosor de las hojas. La succulencia puede producirse al incrementar el tamaño de las células del mesófilo y el tamaño relativo de sus vacuolas o incrementando el número de capas del tejido esponjoso (Benzarti et al. 2014).

Otros resultados de trabajos que evaluaban cortes por microscopía, refieren incrementos en la síntesis de cutina en las células epidérmicas frente al estrés salino en comparación con los testigos. Mediante este mecanismo, la cutícula cumple un rol crítico en los mecanismos de tolerancia frente al estrés salino restringiendo la transpiración y evitando la deshidratación (Kosma & Jenks 2007; Samuels et al 2008). La pérdida de agua en los tejidos vegetales tendrá un fuerte impacto en la expansión celular, división celular, apertura estomática y acumulación de ácido abscísico (Negrao et al. 2017).

Desde el punto de vista anatómico estructural y respecto a las observaciones de los cortes tangenciales de hojas de las plantas testigo y de las atacadas por trips los cambios documentados fueron:

- El aplastamiento tangencial de las células epidérmicas atacadas y algunas células del mesófilo vacías
- En algunos cortes histológicos se constató, en áreas circunscriptas, el colapso completo de la epidermis.
- La observación magnificada de la pared tangencial externa de células epidérmicas adaxiales exhibió signos de destrucción parcial que se vieron como áreas

translúcidas. Estas áreas se ubicaron intercaladas entre áreas no afectadas, intensamente teñidas con la coloración metacromáticas de azul de toluidina.

-Es interesante documentar el aspecto de la pared tangencial externa intacta en células epidérmicas que no han sido afectadas por trips.

Steebergen et al. 2018 refieren que tanto las larvas como los adultos de Trips perforan con sus estiletes el tejido vegetal alimentándose del contenido celular. Este proceso abarca tres etapas: a) perforación, b) salivación y c) ingestión del contenido celular que eventualmente resulta en pérdida de clorofila y una menor eficiencia fotosintética (Kindt et al. 2006; Gill et al. 2015). Las células epidérmicas perforadas colapsan y algunos autores refieren observaciones en *Allium cepa* L. y *Secale cereale* donde los trips removieron también el contenido de las células del mesófilo que se presentaron vacías en las zonas donde colapsó la epidermis (Boateng 2014; Chisholm y Lewis 2009) en forma similar a lo ocurrido en nuestro experimento. Por otra parte de acuerdo a Scott-Brown et al. 2016 el ataque de trips se produjo sobre hojas adultas sugiriendo la presencia de mayor cantidad de defensas localizadas en las hojas más jóvenes.

### **3.6 Conclusiones:**

Frente al estrés salino los genotipos utilizados vieron afectado su crecimiento pero este efecto no fue diferencial entre el genotipo clasificado como tolerante y el genotipo clasificado como susceptible.

Los tratamientos de sal aplicados en el agua de riego redujeron la biomasa total producida (de los tallos y las hojas y de la raíz), la materia seca de los tallos, las hojas y las raíces (en gramos), el número de las ramificaciones y la longitud de los tallos y la longitud de las raíces de las plantas tratadas respecto de los testigos. Asimismo el

porcentaje de materia seca de los tallos y las hojas aumentó en las plantas que sufrieron el estrés salino y el porcentaje de materia seca de las raíces no cambió.

En cambio, en las observaciones realizadas sobre las plantas que sufrieron el estrés biótico producido por trips no se encontraron diferencias respecto a la biomasa total producida de tallos y hojas ni al porcentaje ni a los gramos de materia seca producidos entre las plantas atacadas y las plantas testigos.

Sobre los cortes histológicos preparados para su observación por microscopía óptica se esperaba evaluar si se producían cambios anatómico estructurales que se asociaran al estrés salino o al estrés biótico.

Respecto al estrés salino se observó en los cortes de las hojas, los tallos y las raíces que aumentaban el grosor de las células epidérmicas y también el grosor de las paredes de los elementos de vaso y fibras, sin embargo se reducía el diámetro de los elementos de vaso en las plantas que fueron sometidas al estrés salino respecto de las plantas testigo. Respecto a los tallos se observó que en las plantas que fueron regadas con sal aumentó el tamaño de los cloroplastos en el parénquima cortical y se redujo el diámetro de los tallos, los estomas de la epidermis de los tallos se observaban cerrados.

En las hojas de las plantas que sufrieron el estrés salino, los estomas se encontraban cerrados, aumentaba el espesor de las hojas y aumentaba el tamaño de los cloroplastos en las células del mesófilo.

En las raíces de las plantas que fueron regadas con sal se observó abundante presencia de almidón en el tejido parenquimático.

En función de los resultados encontrados se puede observar que las plantas de *L. tenuis* frente al estrés salino respondieron posiblemente con diversos mecanismos para atenuar el efecto de la sal en el agua de riego que produjeron modificaciones anatómico estructurales a nivel de las hojas, los tallos y las raíces.

Respecto al estrés biótico producido por trips, en este experimento no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento evaluados (producción de biomasa y materia seca de hojas y tallos) pero sí se observaron cambios a nivel anatómico estructural que muestran que el ataque existió y tuvo consecuencias apreciables a nivel de las hojas. Esto sugeriría que las plantas de algún modo habrían compensado las consecuencias del ataque con la intensidad provista en este experimento. Queda para un futuro repetir la experiencia con un ataque de mayor intensidad para determinar cuál sería el límite de dicho mecanismo de compensación.

## **4. Capítulo 4. Respuestas químicas de la pared celular frente al estrés salino y respuestas hormonales y nutricionales asociadas.**

### **4.1 Introducción**

Las paredes celulares no poseen una estructura rígida ni estática, sino que se comportan como una matriz químicamente dinámica (Hematy et al. 2009; Kesten et al. 2017). Las respuestas químicas y bioquímicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en cambios a nivel celular, que generan señales sistémicas emanadas de los sitios afectados que pueden modificar la composición química de la pared celular. Gran parte de la resistencia de las plantas a los factores abióticos involucran a las paredes celulares, cuya función es, en términos generales, dar a la planta forma, rigidez y resistencia mecánica y a adversidades medioambientales (Kesten et al. 2017). Por otro lado, las características químicas de las paredes celulares de las especies forrajeras pueden afectar la digestibilidad y su calidad como forrajes (Van Soest 1994).

En este capítulo se evaluarán los efectos de las condiciones de estrés abiótico salino sobre el desarrollo de las plantas y la composición química de las paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis*, y su efecto sobre la digestibilidad y cinética de digestión.

### **4.2 Objetivos**

1. Caracterizar la composición química y estructural de las paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis* en estado vegetativo.
2. Determinar la variación de las características químicas de las paredes celulares de hojas y tallos de líneas de *L. tenuis* tolerantes o susceptibles a ambientes salinos en estado vegetativo cultivadas con diferentes niveles de cloruro de sodio en el suelo.

3. Determinar el contenido de las fitohormonas de defensa ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (SA), ácido jasmónico-isoleucina, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido indol acético y ácido abscísico frente a las condiciones de estrés biótico y abiótico salino.
4. Observar la complementariedad y diferencias entre las metodologías de FDN, FDA, la técnica de producción de gas y los métodos más específicos de laboratorio para la caracterización de los componentes de la pared celular por extracción secuencial de los mismos y su análisis por métodos espectrofotométricos y la determinación de monosacáridos constituyentes por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa por impacto electrónico.

#### **4.2.1 Hipótesis de trabajo:**

H1) El estrés salino produce cambios en la composición química de las paredes celulares de tallos y hojas en estado vegetativo de *L. tenuis*, y este efecto es diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles al estrés salino.

- a. La modificación en las paredes celulares de *L. tenuis* y en la estructura de los polisacáridos que las constituyen son mecanismos importantes para la aclimatación de estas plantas terrestres a los ambientes de alto grado de salinidad. Esta modificación, no sólo implica un cambio en el grosor de las paredes y el tamaño de las células, sino que además podría tener consecuencias en la composición en los polisacáridos de la pared y su estructura fina.
- b. La diferencia en el comportamiento de las variedades resistente y susceptible al estrés salino en *L. tenuis* podría relacionarse, en parte, con diferencias en las paredes celulares de las mismas.
- c. Genotipos de *L. tenuis* tolerantes a salinidad en estado vegetativo podrían presentar alteraciones en la composición química de las paredes celulares que podría

evidenciarse por una mayor concentración de polisacáridos ácidos, especialmente en el contenido de pectinas.

H3) Los cambios morfológicos y químicos en las paredes celulares de *L. tenuis* debido al estrés salino afectan la calidad nutricional de los tallos y las hojas de las plantas en estado vegetativo, afectando su digestibilidad potencial.

- a. Además del descenso en la biomasa total como consecuencia de la adaptación al estrés salino, el engrosamiento en las paredes celulares y otros cambios a nivel molecular podrían producir una diferencia en la digestibilidad potencial de *L. tenuis*.
- b. Una disminución en el contenido de pectinas en los genotipos de *L. tenuis* susceptibles afectaría negativamente la digestibilidad de los tallos y de las hojas. Un aumento en la concentración de celulosa y de lignina como consecuencia de la adaptación al estrés salino reduciría la digestibilidad de la pared, por la menor digestibilidad intrínseca de esos compuestos y por su efecto barrera al aprovechamiento potencial del contenido celular.
- d. El ácido jasmónico y el ácido salicílico podrían tener una función moduladora en los cambios químicos de las paredes celulares producidos por estrés salino. Un aumento en la concentración de estas fitohormonas podría regular los cambios químicos de la pared.
- e. La complementariedad de los análisis efectuados permitiría explicar con mayor exactitud los cambios encontrados a nivel de pared celular debido al estrés salino.

### 4.3 Materiales y métodos

De acuerdo a lo presentado en el Capítulo 2. Materiales y métodos; 2.1 (Germinación, bandejas y trasplante en macetas); 2.2 (Tratamientos); 2.3 (Medición de variables del ambiente) y con el objetivo de determinar el efecto del estrés salino sobre

distintos parámetros nutricionales y cambios en la pared celular de hojas y tallos, se realizaron los siguientes experimentos utilizando semillas de *Lotus tenuis* de dos familias de medios hermanos (FMH) que presentaban distinta susceptibilidad frente al estrés salino.



Figura 57: Esquema del experimento para evaluar el efecto del estrés abiótico salino producido en plantas de *Lotus tenuis* que presentaban distinta tolerancia frente al estrés. Imágenes a-d: a: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: Bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas; d: Vista general del experimento bajo invernáculo; e: Aspecto general de las plantas cosechadas.

Luego de obtenidas las plantas, se realizaron las mediciones de los siguientes parámetros de nutricionales:

#### 4.3.1 Determinación de parámetros nutricionales

Las hojas y los tallos, previamente secados en estufa con aire forzado a 65°C hasta peso constante, fueron molidas en un molino Dalmau (Argentina), hasta que las partículas pasaron a través de una malla de 2 mm. Sobre las muestras molidas, se determinó el contenido de materia seca a 105°C (MS105), utilizando estufas con circulación de aire durante 4 hs y, posteriormente, se determinó el contenido de cenizas (CEN) por ignición en mufla a 600°C por 2 hs, AOAC 942.05 (AOAC International, 1990). El contenido de fibra insoluble en detergente neutro (aFDNmo), fibra insoluble en detergente ácido



(FDAmo) y lignina insoluble en detergente ácido (LDA) se determinó según Ankom (2005) y Goering and Van Soest (1970). El contenido de celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEMI) se calculó por diferencias ( $CEL = FDA_{mo} - LDA$ ,  $HEMI = aFDN_{mo} - FDA_{mo}$ ). El valor de nitrógeno (N) total se determinó por el método de Kjeldhal, multiplicando luego los valores obtenidos por 6,25 para expresarlos como proteína bruta (PB) AOAC 976.05 (AOAC International, 1990). Las muestras se caracterizaron además por la cinética de degradación a través de la técnica de producción *in vitro* de gas (PG), Theodorou *et al.*, 1994) y por la digestibilidad *in vitro* a las 48 hs de la MS (DMS) y la digestibilidad de la fibra detergente neutro (DFDN).

#### **4.3.2 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA)), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA):**

La cuantificación de las fitohormonas se realizó por HPLC-MS-MS en colaboración con el Dr. Axel Mithoefer del Max Planck de Ecología Química, utilizando el método de Vadassery *et al.* (2012) adaptado a soja de acuerdo a lo referido en el capítulo 2, 2.2.8.

#### **4.3.3 Extracción de polisacáridos de la pared celular**

De acuerdo a lo descrito en 2. Materiales y métodos, 2.2.2 Extracción de polisacáridos de la pared celular, se realizó la extracción de los polisacáridos de la pared celular de las hojas y de los tallos secos y molidos (2mm) separadamente, en forma secuencial siguiendo el procedimiento estándar (Fry 1998) para cada repetición de los experimentos llevados adelante en el año 2012 y 2016.

Cada uno de los residuos y los sobrenadantes (extractos) obtenidos, se trataron separadamente, fueron dializados y liofilizados para las determinaciones posteriores. Se obtuvieron en total para cada tratamiento once extractos, y un residuo final.

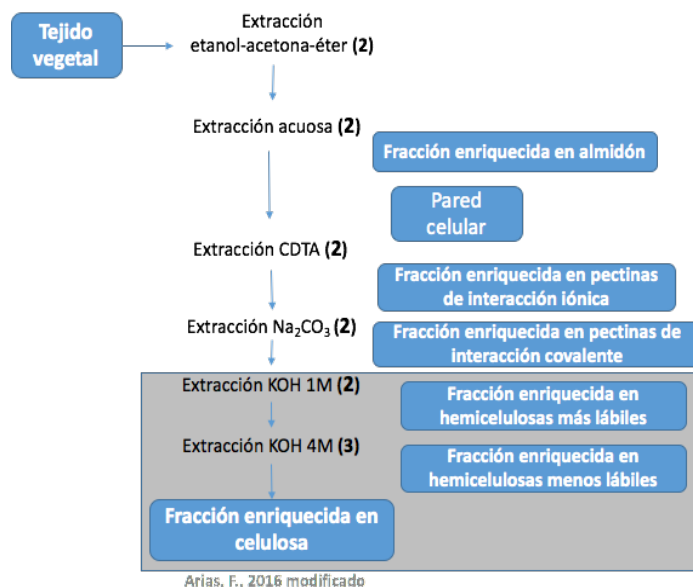


Figura 58: Esquema general de extracción secuencial de las paredes celulares. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos indicados. Los números entre paréntesis indican el número de extracciones secuenciales realizadas con cada solvente.

#### 4.3.4 Métodos generales de análisis de componentes de la pared

##### 4.3.4.1 Determinaciones colorimétricas del contenido en hidratos de carbono totales y el contenido de ácidos urónicos.

El contenido de azúcares totales fue analizado con el método fenol-ácido sulfúrico ( $\text{PhOH-H}_2\text{SO}_4$ , Dubois et al. 1956) y el contenido de ácidos urónicos se determinó por el método de Filisetti-Cozzi et al. 1991 de acuerdo a lo explicado en el Capítulo 2, 2.2.7.1. En este trabajo, se utilizó la adaptación de ambos métodos para material insoluble (Ahmed & Labavitch 1977), lo que implica una digestión previa del material con ácido sulfúrico concentrado, hasta disolución completa del mismo.

##### 4.3.4.2. Determinación de la composición en monosacáridos neutros.

Se realizó la determinación de los monosacáridos componentes de los extractos obtenidos en la secuencia extractiva descrita y del residuo final (Rf) por cromatografía

gaseosa (CG) utilizando detección por ionización de llama (FID) o espectrometría de masa como detectores. Para ello, en primer lugar, las muestras fueron hidrolizadas. La hidrólisis consiste en la ruptura de los enlaces glicosídicos de los polisacáridos, quedando los monosacáridos estables en el medio de reacción ácido.

Luego de la hidrólisis, los monosacáridos se modifican químicamente (se derivatizan), de forma tal de obtener derivados volátiles en las condiciones en que se realiza la cromatografía gaseosa. La derivatización incluye la reducción de los monosacáridos a alditoles y luego la acetilación de los mismos por reacción del anhídrido acético con cada uno de los OH del alditol (conversión de los monosacáridos a sus correspondientes acetatos de alditoles), utilizando piridina como catalizador de la reacción de acuerdo a lo explicado en el Capítulo 2, 2.2.7.2.

Por otra parte, para detectar y cuantificar los ácidos urónicos presentes en la pared, para algunas muestras representativas, se cuantificaron los ácidos galacturónico, glucurónico y ácido 4-*O*-metilglucurónico, de acuerdo a la metodología de Lehrfeld 1987 y Walters & Hedges 1988, modificada por Zelaya et al 2017, que permite su detección y cuantificación por cromatografía gaseosa (GC/MS). Las muestras fueron analizadas usando un cromatógrafo gas-líquido Agilent 7890A (Avondale PA, USA) equipado con dos detectores, uno de ionización de llama (FID) y otro de espectrometría de masa por impacto electrónico Agilent 5977<sup>a</sup> (MS-EI) (Ver Capítulo 2, 2.2.7.2).

En el cromatograma obtenido, una vez identificados los componentes de las muestras respecto a una corrida patrón, se cuantificó su abundancia de acuerdo al área bajo los picos, cuyo valor es calculado por el software del integrador. Para evitar sobre o subestimaciones, se realizó una corrección tomando en cuenta el peso molecular (PM) de cada azúcar. De este modo, los valores obtenidos se expresaron en moles %.

#### 4.4 Resultados

De acuerdo a los resultados encontrados respecto a la alteración de ciertos parámetros de crecimiento y los cambios documentados a nivel de hoja, tallo y raíz en respuesta al estrés salino y al ser esta una especie muy utilizada como forraje se procedió a realizar las determinaciones químicas de % fibra detergente neutro (aFDNmo), fibra detergente ácido (FDAmo) y lignina, para observar si con estas determinaciones, que son las más comúnmente utilizadas en los establecimientos ganaderos para estimar la calidad de los forrajes, se observaban cambios respecto al estrés salino que pudieran ser significativos para el aprovechamiento de esta especie por rumiantes en el pastoreo.

Estos parámetros evaluados corresponden al Sistema de detergentes de Van Soest que fue desarrollado para cuantificar y describir la pared celular vegetal. A través de ellos se puede estimar el consumo voluntario (en función de FDN) y el coeficiente de digestibilidad (utilizando FDA) para rumiantes en pastoreo. Asimismo, por diferencia entre %FDN y %FDA se calcula el contenido de hemicelulosas y por diferencia entre el %FDA y %Lignina el contenido de celulosa (Jung 1997, Van Soest 1994).

A continuación se presentan los resultados de las determinaciones realizadas.

#### 4.4.1 Observaciones respecto a los parámetros nutricionales evaluados

##### 4.4.1.1 Parámetros nutricionales evaluados en tallos

De acuerdo con los resultados encontrados no se observó interacción significativa entre las dosis y los genotipos para las determinaciones de % FDN ( $p=0,5$ ) y % FDA ( $p=0,7$ ) de los tallos.

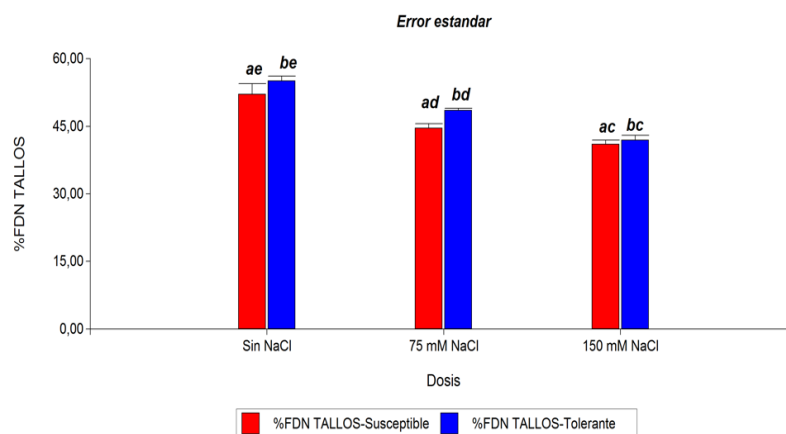


Figura 59: Porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) en tallos para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos utilizados respecto al % de fibra detergente neutro ( $p=0,03$ ), presentando el genotipo susceptible una media de FDN 5,38% menor que el genotipo tolerante. Con respecto a las dosis de sal en el agua de riego, se observó que el % de fibra detergente neutro disminuía a medida que se incrementaba el estrés salino ( $p<0,01$ ) observándose unas medias de: 53,56% media %FDN para el testigo, 46,53 media % FDN Dosis 1 y 41,47 media % FDN Dosis 2 (Figura 59).

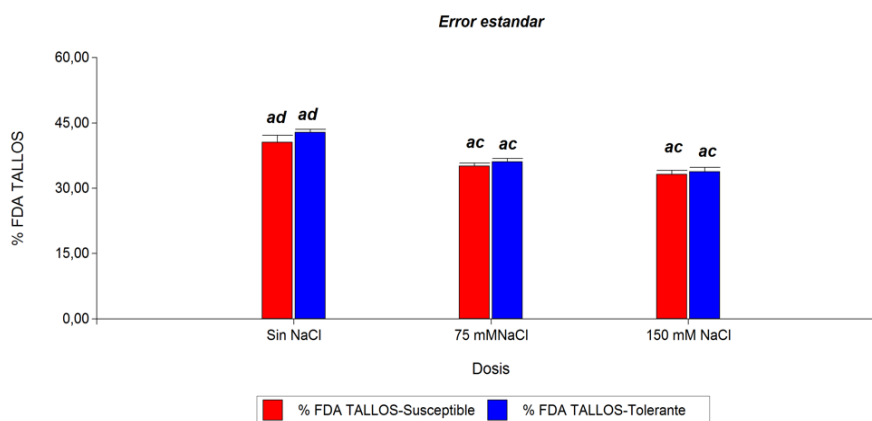
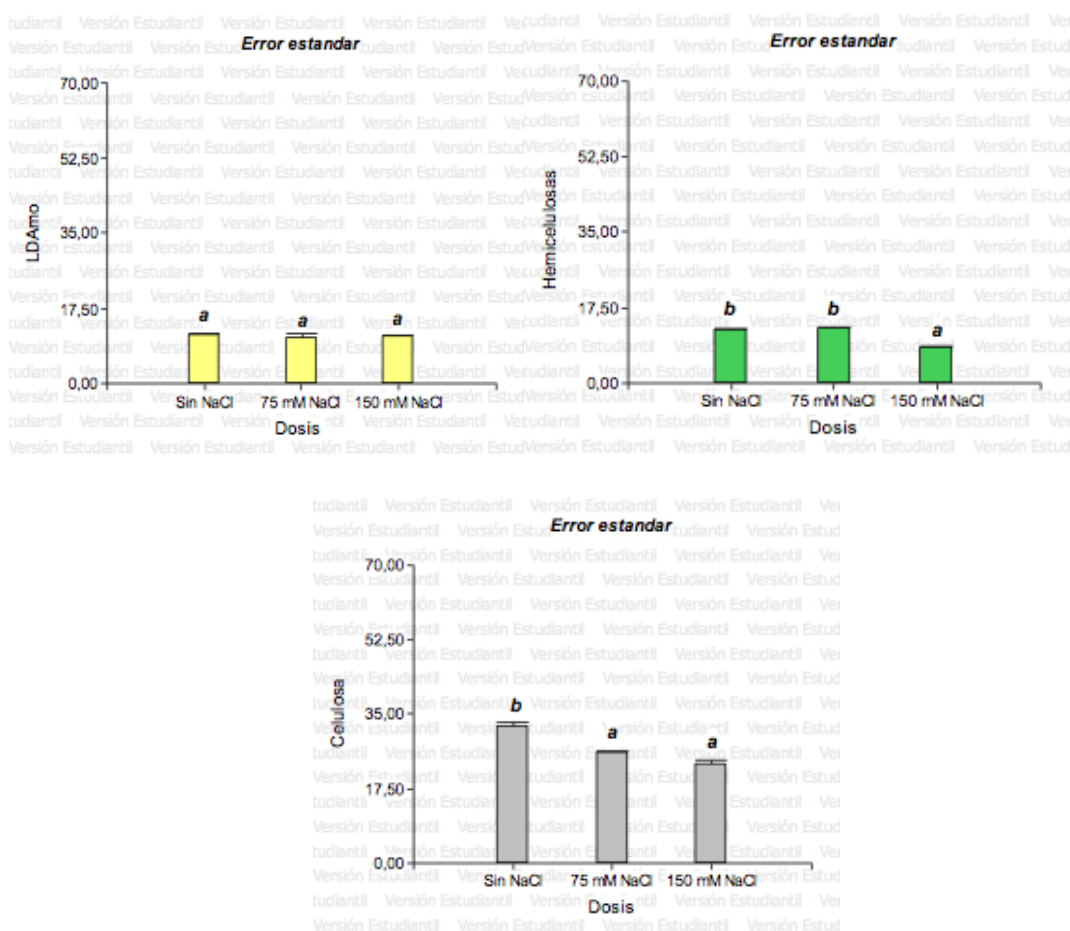


Figura 60: Porcentaje de fibra detergente ácida (FDA) en tallos para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto al % de fibra detergente ácido, no se encontró una diferencia significativa entre los genotipos utilizados ( $p=0,1$ ), pero sí se encontró diferencia significativa entre los testigos y las plantas regadas con 75 y 150 mM de NaCl ( $p<0,001$ ), disminuyendo en 19,64% el valor de FDA entre los testigos y la Dosis 2 (Figura 60). En los tallos analizados, no se detectaron diferencias en el % de proteína bruta, ni en el de nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDA) entre las plantas testigo (PB= 7,5%, NIDA= 0,6%), las regadas con la Dosis 1 (PB= 7,7%, NIDA= 0,5%) y las regadas con la Dosis 2 (PB=7,3%, NIDA= 0,6%). El porcentaje de cenizas, en cambio, aumentó al acentuarse el estrés (% cenizas testigos= 7,9%, % cenizas Dosis 1= 11% y % cenizas Dosis 2=13,9%).

De acuerdo a lo observado en la Figura 61, no se observaron diferencias significativas respecto al % de lignina entre los tallos de las plantas testigo y los de las plantas que fueron regadas con sal ( $p=0,4$ ), respecto al % de hemicelulosa, se observó solamente una diferencia significativa con respecto a la dosis 150 mM de NaCl en el agua de riego (Dosis 2), pero no entre las testigo y las que recibieron la Dosis1 ( $p=0,02$ ). En

relación al % de celulosa, en cambio, se observó que existía una diferencia significativa entre las plantas regadas con sal y las plantas testigo para el genotipo tolerante ( $p=0,03$ ).



Figuras 61. a-b-c Porcentaje de Lignina, Hemicelulosa y Celulosa en tallos de las plantas tolerantes para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4.1.2 Parámetros nutricionales evaluados en hojas

De acuerdo a los resultados encontrados en las observaciones realizadas sobre las hojas: No se encontró interacción significativa entre las dosis y los genotipos ( $p>0,20$ ) para los % de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el genotipo susceptible y el tolerante para el % de fibra detergente neutro ( $p=0,2$ ) y para el % de fibra detergente ácido ( $p>0,20$ ), (Ver Figuras: 62 y 63).

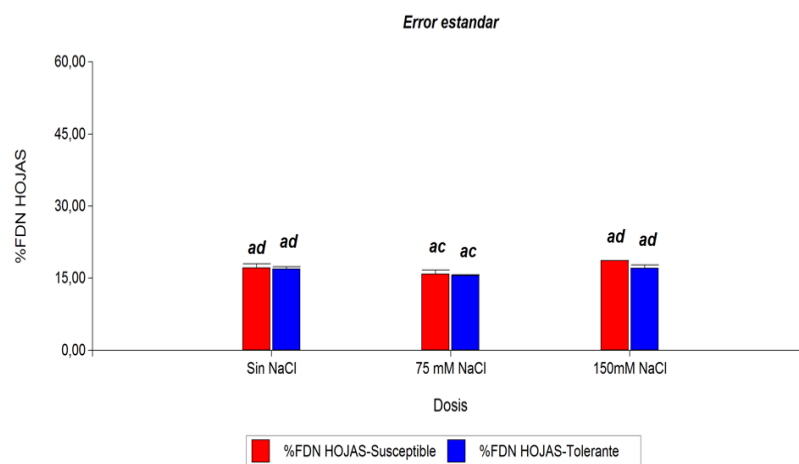


Figura 62: Porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) en hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Respecto a la dosis de sal empleada en el agua de riego, se encontró diferencia significativa entre los testigos (media: 17,05% FDN) y la Dosis 2 (media: 17,86% FDN) con respecto a la Dosis 1 (media: 15,70% FDN), ( $p=0,0119$ ), (Ver figura: 62).

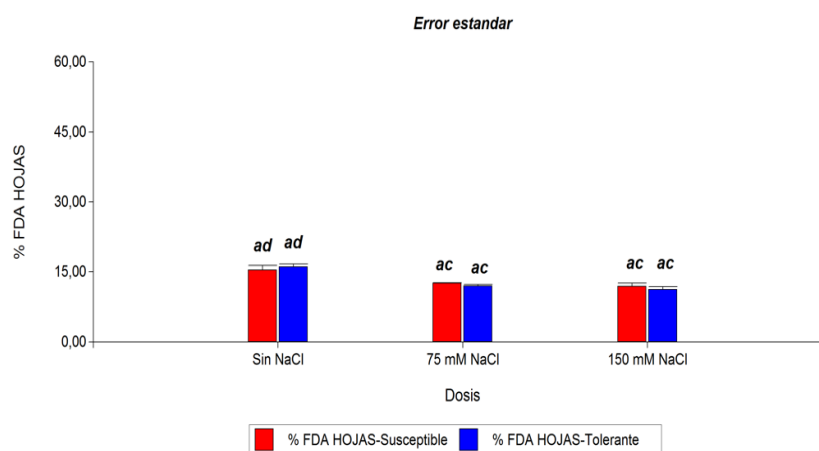


Figura 63: Porcentaje de fibra detergente ácido (FDA) en hojas para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Al analizar el % de fibra detergente ácido en las muestras de hojas de las plantas testigo y de las sometidas al estrés salino, se observó que existen diferencias significativas



entre las plantas testigo (media: 15,76% FDA) y las regadas con el tratamiento salino, presentando un %FDA 24,20 % menor que el de las plantas testigo ( $p<0,01$ ), (Figura: 63).

En las hojas analizadas, se detectaron diferencias en el % de proteína bruta entre las plantas testigo y las expuestas al estrés salino (testigo= 28,65 %PB), disminuyendo este parámetro en las plantas sometidas a estrés (Dosis 1= 20,40 %PB y Dosis 2=19,61%PB. El % cenizas, en cambio, aumentó al acentuarse el estrés (% cenizas testigos = 12%, % cenizas dosis 1= 13,2% y el % cenizas dosis 2=15%), al igual que en tallos.

Habiendo encontrado diferencias significativas a nivel de tallos y de hojas respecto a los parámetros analizados en relación con el estrés salino, se decidió utilizar un método *in vitro*, denominado técnica de producción de gases (Theodorou et al. 1994), que permite determinar la extensión y la cinética de la degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo. Esta técnica nos permitiría observar si hubiera, cambios en las primeras fases de la fermentación, de este modo, se podrían detectar los cambios en la fracción más fácilmente digestible de las paredes celulares, correspondientes mayoritariamente a la fracción de pectinas. Este experimento se realizó sobre el residuo insoluble en alcohol (RIA) luego de las extracciones de almidón (ver Materiales y métodos) y no sobre el material vegetal original, debido a que el objetivo era estudiar el comportamiento del material correspondiente a paredes celulares, no involucrando en estos estudios los azúcares de bajo peso molecular (mono-, di-oligosacáridos).

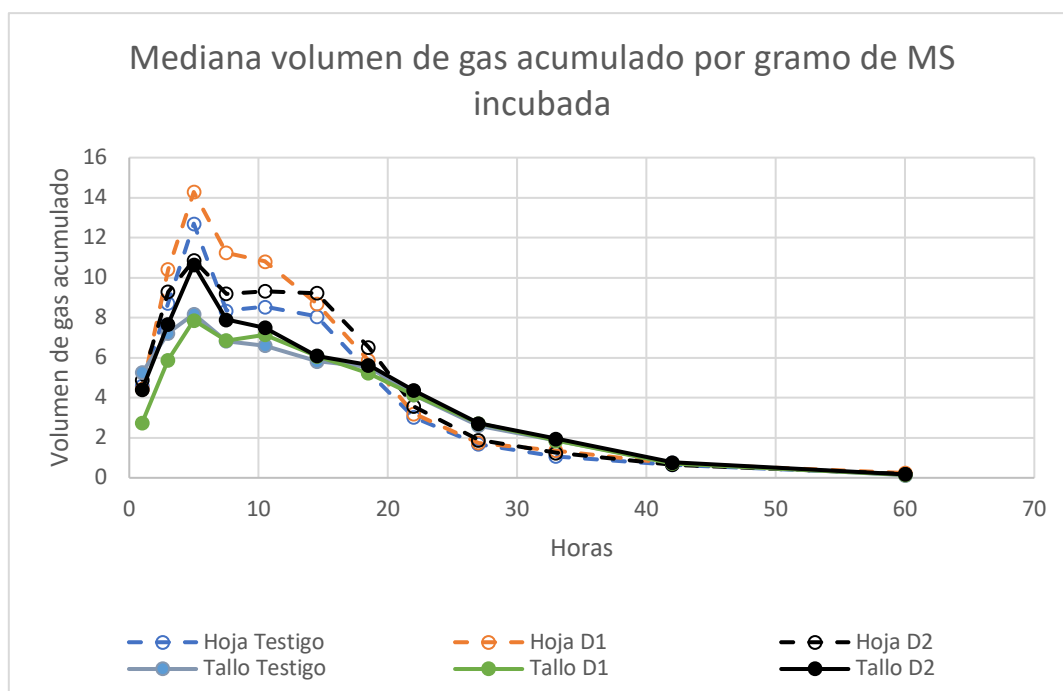


Figura 64: Mediana del volumen de gas acumulado por gramo de materia seca incubada de residuo insoluble en alcohol, acetona y éter (RIA) luego de las extracciones de almidón de tallos y de hojas de la familia de medios hermanos tolerante (D1: Dosis 1= 75 mM de NaCl; D2: Dosis 2= 150 mM NaCl).

En la Figura 64 se muestran las medianas de los resultados obtenidos respecto al volumen de gas acumulado por gramo de materia seca incubada de las muestras de paredes celulares de tallos y de hojas. Como se puede observar, hay diferencia en las tasas de producción de gas entre las hojas (líneas punteadas) y los tallos (líneas continuas), como era de esperar. La diferencia parecería acentuarse en el rango de 0 a 10 hs y en el 10 a 20 hs observándose una mayor tasa de producción de gas para las hojas regadas con la Dosis 1, luego las regadas con la Dosis 2 y luego las testigo. Respecto a los tallos, los sometidos al estrés más severo presentan mayor producción de gas en el rango de 0 a 10 hs.

En el rango de 20 a 40 hs, la tendencia se invierte presentando mayor tasa de producción de gas los tallos, aunque casi no se observaron diferencias entre los tratamientos salinos ni en tallos, ni en hojas. Los resultados encontrados respecto a la digestibilidad *in vitro* de los tallos a las 48 hs mostraron un aumento a medida que el

estrés salino es más severo (Testigo = 56,7% Digestibilidad *in vitro*; Dosis 1 (75 mM NaCl) = 62,1%; Digestibilidad *in vitro* Dosis 2 (150 mM NaCl) = 64,6% Dig *in vitro*).

Respecto a las hojas, no se apreció un cambio significativo debido al estrés. Se obtuvieron los siguientes valores: Testigo = 88,5% Digestibilidad *in vitro*; Dosis 1 (75 mM NaCl) = 87,65%; Digestibilidad *in vitro*; Dosis 2 (150 mM NaCl) = 91,75% Digestibilidad *in vitro*).

#### 4.4.2 Cuantificación de ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA)), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA):

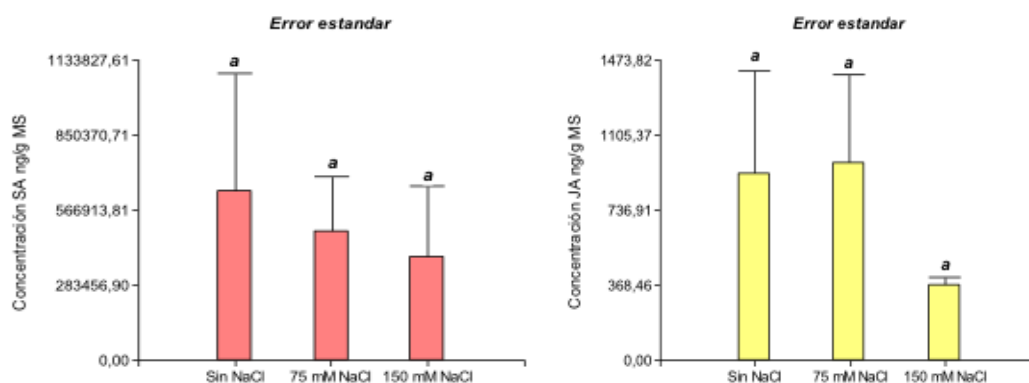


Figura 65: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

De acuerdo a los datos observados, no se encontraron diferencias significativas entre las hojas de las plantas testigo y las que sufrieron el estrés salino respecto al contenido de ácido salicílico ( $p=0,9$ ) y de ácido jasmónico ( $p=0,65$ ), (Figura 65).

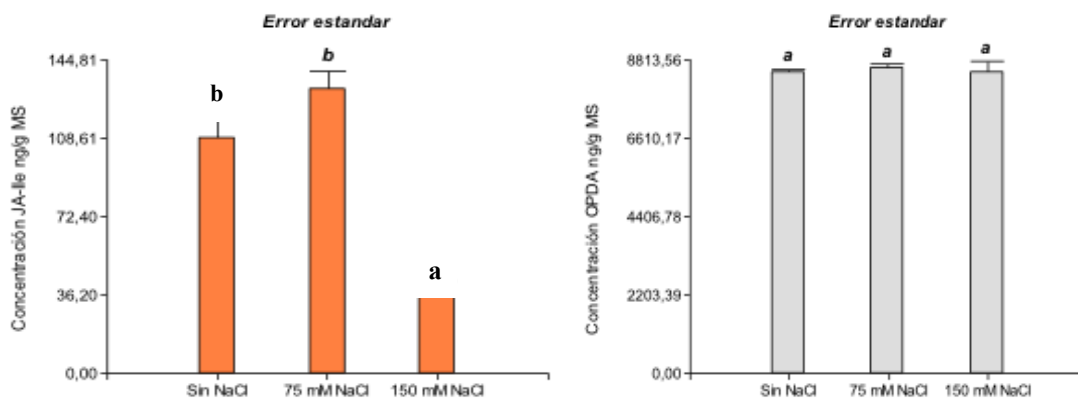


Figura 66: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de ácido jasmónico - isoleucina y ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Respecto a la concentración encontrada de ácido jasmónico - isoleucina en las muestras de hojas, se observó que en las plantas que recibieron el estrés salino más severo, la concentración de JA-Iso se redujo en un 67,99% respecto a las testigo y Dosis 1 ( $p=0,0121$ ). En cambio, no se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA ( $p=0,8702$ ) (Figura 66).

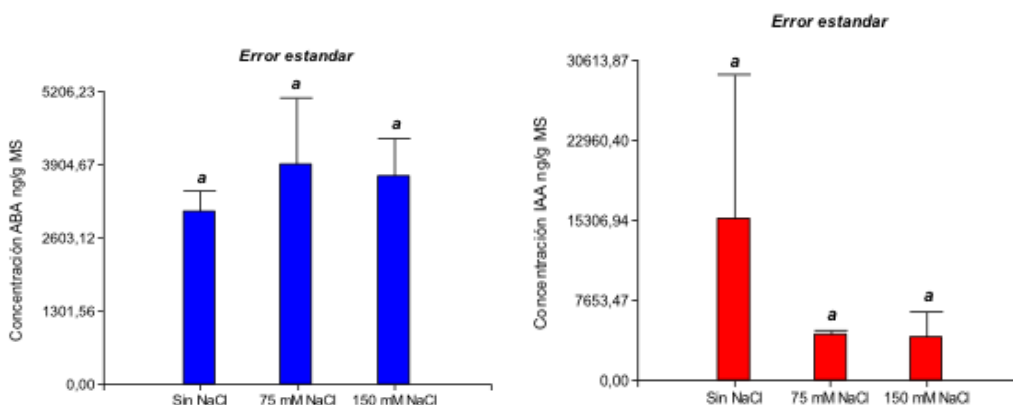


Figura 67: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés abiótico salino en hojas de *Lotus tenuis*. Concentración de ácido indol-acético y ácido abscísico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Por último, se observó que no existían diferencias significativas respecto a la concentración de ácido indol-acético ( $p=0,5$ ) y de ácido abscísico ( $p=0,8$ ) entre las plantas que habían sido sometidas al estrés salino y las testigo, (ver figura 67).

#### 4.4.3 Estudios de polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas

Para caracterizar los polisacáridos que forman parte de las paredes celulares, resulta imprescindible primero aislarlos. En una segunda etapa, es necesario tener en cuenta que entre estos compuestos existen diversos tipos de estructuras, que no pueden estudiarse si se analiza la mezcla como un todo. Una de las formas mas utilizadas para realizar estos estudios consiste en la extracción secuencial de los diferentes tipos de polisacáridos utilizando solventes adecuados, para luego realizar el estudio de la estructura química de los diferentes extractos (Albersheim et al. 2011). Esta metodología presenta la ventaja que, al mismo tiempo que se separan los polisacáridos de la pared, se realiza una primera purificación de los mismos manteniendo, en gran medida, su integridad.

Hay muchas variantes respecto a los solventes (en general, acuosos) utilizados. En este trabajo, se eligió realizar primero una secuencia extractiva con diferentes solventes orgánicos con la finalidad de obtener una primera purificación del material correspondiente a las paredes celulares. Para ello, el material seco y molido se extrajo secuencialmente en dos oportunidades con etanol, dos veces con acetona y una vez con éter etílico. De este modo, se logró eliminar los componentes de bajo peso molecular, así como el material citoplasmático, lípidos, pigmentos, etc., estos extractos no se analizaron, ya que no son de interés para el desarrollo de este trabajo. El residuo de este proceso de extracción (residuo insoluble en alcohol, RIA) está constituido principalmente por componentes de las paredes celulares. El mayor contaminante son los  $\alpha$ -glucanos de reserva. Estos polímeros pueden eliminarse por tratamiento del material con  $\alpha$ -amilasa, o simplemente descontar la glucosa de los restantes monosacáridos de pared celular

determinados en las primeras etapas de extracción. Otra opción es el tratamiento del RIA con dimetilsulfóxido (DMSO), que es un solvente polar aprótico, que se ha utilizado con esta finalidad. El problema que tiene esta última metodología es que el residuo que contiene las paredes celulares queda impregnado con el solvente, que es de muy difícil eliminación debido a su alto punto de ebullición (p.e.=189°C).

Ante estas opciones, se hicieron algunos experimentos preliminares.

La opción de descontar directamente el contenido de glucosa en los primeros pasos de la secuencia extractiva es posible en este caso, ya que se sabe que dentro de los polisacáridos de paredes celulares de dicotiledóneas, sólo se encuentra glucosa como parte de hemicelulosas que se extraen recién con solventes de extracción alcalinos y celulosa en el residuo final.

Como experimento preliminar se eligieron dos residuos de la extracción con solventes (RIA) de hojas, uno correspondiente al testigo de las plantas tolerantes al estrés salino, (muestra A) y otro que correspondía a las plantas susceptibles tratadas con la mayor dosis de sal (muestra B). A cada una de estas muestras se las trató de dos modos diferentes:

1.- Se realizaron extracciones sucesivas con agua a ebullición.

2.- Se realizó el tratamiento con  $\alpha$ -amilasa.

El Cuadro 2 A y B indica los resultados del análisis de las fracciones obtenidas (tanto residuos como sobrenadantes).

Se hicieron los siguientes experimentos para decidir como tratar este tema y se concluyó:

A)

Hojas Testigo Tolerante	Rendimiento %	Azúcares totales %	Ácidos urónicos %	Composición en monosacáridos (Moles%)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
S1H2OØ	18,6	27,1	3,6	12,9	ns	23,6	ns	ns	6,8	56,6
S2H2OØ	5,8	31,1	5,9	10,9	ns	18,2	5,9	ns	8,4	56,6
RH2OØ2	61,2	41,5	12,3	4,3	1,3	23,4	7,0	3,1	7,8	53,2
S3H2OØ	6,7	27,5	5,7							
S4H2OØ	3,3	29,6	6,3							
RH2OØ4	53,3	34,4	6,9							
Sα-amilasa	1,8	23,1	2,8	6,1	1,2	44,1	3,5	5,8	22,2	17,1
Rα-amilasa	37,7	26,2	6,7	4,2	2,0	6,7	8,1	4,3	6,4	68,3

B)

Hojas Dosis 2 Susceptible	Rendimiento %	Azúcares totales %	Ácidos urónicos %	Composición en monosacáridos (Moles%)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
S1H2OØ	13,4	26,1	1,1	7,3	ns	20,5	ns	7,5	6,1	58,6
S2H2OØ	18,8	22,3	1,1	7,6	ns	23,3	4,1	ns	5,2	59,8
RH2OØ2	58,9	49,6	13,7	3,4	1,1	17,6	6,0	3,2	6,3	62,5
S3H2OØ	7,5	26,0	5,3							
S4H2OØ	5,0	25,4	6,4							
RH2OØ4	50,0	46,9	6,5							
Sα-amilasa	1,6	31,7	7,1	5,3		53,2	3,2	3,3	21,8	13,2
Rα-amilasa	31,4	31,6	5,7	3,6	2,0	11,5	11,3	4,2	6,5	60,9

S1H2OØ: Sobrenadante 1 extracción con agua caliente; S2H2OØ: sobrenadante 2 extracción con agua caliente; RH2OØ2: Residuo final extracción 1 y 2 con H2O caliente; S3H2OØ: Sobrenadante 3 extracción con agua caliente; S4H2OØ: Sobrenadante 4 extracción con agua caliente; RH2OØ4: Residuo final extracción con agua caliente; Sα-amilasa: Sobrenadante extracción con alfa amilasa; Rα-amilasa: Residuo extracción α-amilasa.

Cuadro 2: A y B: Resultado de las determinaciones realizadas sobre los RIA de hojas testigo de las plantas tolerantes (muestra A) y de las plantas susceptibles tratadas con 150 mM NaCl (muestra B) en dos condiciones diferentes: 1) al ser extraídas con agua a ebullición (H2OØ) y 2) al ser tratadas con α-amilasa.

Para ambas muestras se observó un comportamiento similar. Si bien el tratamiento con α-amilasa produjo una importante purificación de la muestra en un solo paso, aún quedó un porcentaje importante de glucosa posiblemente proveniente de α-glucanos en el sobrenadante, lo que significa que la digestión con α-amilasa no fue completa. Se observó también una cierta pérdida de material que podría provenir de la pared. Por estos

motivos, se decidió hacer las extracciones con agua caliente, en lugar de realizar la purificación por tratamiento con la enzima. Una ventaja adicional, aunque no directamente relacionada con los objetivos de la tesis, es que se pudo cuantificar el contenido parcial y total de  $\alpha$ -glucanos en las muestras, con lo cual, se obtuvieron evidencias respecto a la variación del contenido de estos polímeros como consecuencia del estrés salino (ver mas adelante). Esta información resulta muy relevante a la hora de evaluar los parámetros nutricionales de este forraje en las diferentes condiciones estudiadas.

#### 4.4.3.1 Extracción secuencial de los polisacáridos de paredes celulares de tallos.

##### 4.4.3.1.1. Experimentos preliminares

En los primeros pasos de la secuencia extractiva realizada para determinar el efecto del estrés salino sobre los tallos de *Lotus tenuis*, se trabajó con tres réplicas para cada uno de los tratamientos medidos, utilizando las dos familias de medios hermanos, (FMH 490) la tolerante y la (FMH 2241) susceptible. Estos pasos fueron 1) La obtención del residuo RIA y 2) las extracciones de RIA con agua caliente y la obtención de los dos extractos acuosos. Los resultados obtenidos mostraron que no había interacción significativa entre los genotipos y las dosis para el % de residuo insoluble en alcohol (RIA) ( $p > 0.11$ ).

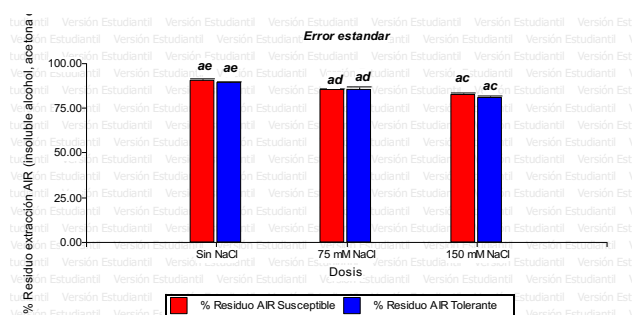


Figura 69: Porcentaje de residuo insoluble en alcohol (RIA) obtenido de tallos de la FMH 490 o Tolerante y de la FMH 2241 o Susceptible para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.



Respecto al residuo insoluble obtenido luego de las extracciones con alcohol acetona y éter etílico (RIA), se observó que no había diferencia significativa entre los genotipos ( $p=0,45$ ), pero sí había una disminución significativa a medida que el estrés se hacía más severo, reduciéndose en 5,24% en la Dosis 1 y 9,35% en la Dosis 2 ( $p=0,001$ ), (Figura 69).

A continuación, se realizó la extracción de los RIA de tallos en dos oportunidades, secuencialmente con agua caliente, estos dos extractos se juntaron y se recuperó el contenido (extracto obtenido con  $H_2O$  y se determinó que no había diferencias significativas en el porcentaje de polisacáridos extraídos entre los genotipos tolerante y susceptible ( $p=0,08$ ). Por otra parte, sí se encontraron diferencias significativas respecto a la dosis de sal en el agua de riego ( $p<0,001$ ), disminuyendo el porcentaje de residuo recuperado a medida que aumentaba el estrés salino. La Dosis 1 disminuyó un 8,05% y la Dosis 2 disminuyó un 13,62% con respecto a los testigos, (Figura 70).

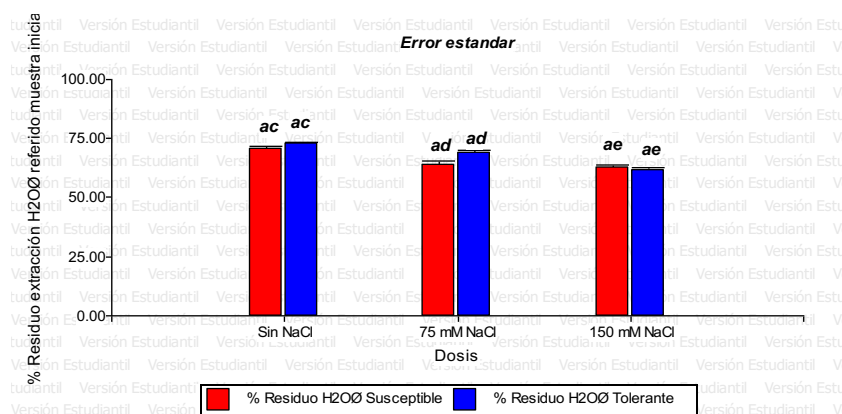


Figura 70 Porcentaje de residuo obtenido de tallos para cada tratamiento salino luego de dos extracciones con agua caliente. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

En relación a los extractos recuperados luego de las dos extracciones realizadas sobre el residuo RIA, se observó que no existían diferencias significativas en cuanto a los genotipos analizados ( $p=0,1$ ), en cambio respecto la dosis de sal empleada en el agua de

riego mostró un aumento significativo entre la Dosis 2 y los testigos, aumentando en un 34,9% ( $p=0,07$ ), (ver figura 71).

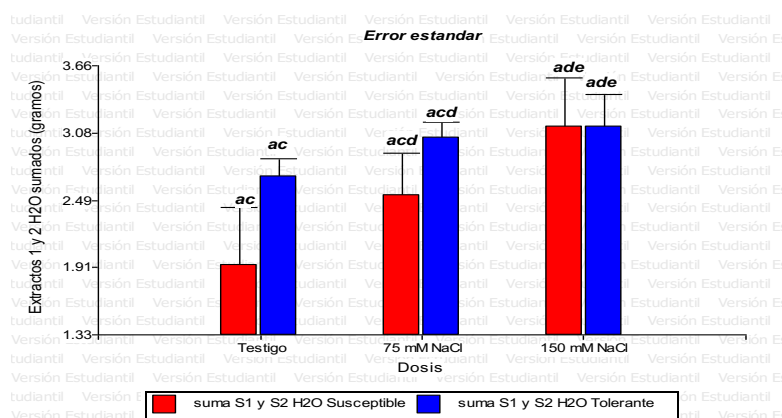


Figura 70: Sumatoria de los extractos S1 y S2 de tallos obtenidos luego de realizar dos extracciones con agua caliente sobre el residuo RIA para cada tratamiento salino. Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ). La primera letra se encuentra asociada al genotipo y la segunda a la dosis de sal empleada.

Luego, para ahondar en el análisis de posibles diferencias entre ambos genotipos, se realizaron pooles con los residuos obtenidos luego de las extracciones de alcohol acetona y éter etílico (RIA), utilizando las tres replicas de cada tratamiento en el armado de cada pool y se analizó la composición en monosacáridos de las muestras de los residuos obtenidos luego de la extracción acuosa (Cuadro 3). Si bien idealmente hubiera resultado conveniente realizar el trabajo completo para cada réplica por separado, el volumen del trabajo planteado hizo completamente imposible seguir por esa vía, por este motivo, consideramos que la realización de pooles es una herramienta adecuada. Es de destacar que para este tipo de trabajo la forma planteada es la habitual, obteniéndose en muchos casos resultados adecuados (Fry 1988; Lima et al. 2013, 2014). Como puede verse, no se observaron diferencias en la composición en monosacáridos obtenidos entre tolerantes y susceptibles, tanto para los testigos como para las plantas que fueron regadas con la Dosis 2 (Cuadro 3).

	Composición en monosacáridos (Moles %)						
Pooles	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Testigo tolerante	2,0	0,3	8,7	18,1	4,8	6,6	59,5
Testigo susceptible	2,1	0,2	9,0	18,8	4,3	6,1	59,5
Dosis 2 Tolerante	2,2	0,2	16,8	17,5	4,1	6,8	52,3
Dosis 2 Susceptible	2,3	0,3	16,4	20,0	3,8	6,5	50,7

Cuadro 3: Composición de monosacáridos en moles % de los residuos obtenidos luego de las extracciones acuosas de los tallos de *Lotus tenuis* correspondientes a la FMH 490 o tolerante y las FMH 2241 o susceptible testigos y las regadas con la Dosis 2 de 150 mM de NaCl.

Al no encontrar diferencias significativas entre los genotipos utilizados en este trabajo (Figuras 69, 70 y 71), y teniendo en cuenta los resultados presentados en el Capítulo 3 respecto a la respuesta de los genotipos en los distintos parámetros de crecimiento evaluados (Capítulo 3, 3.4.1.a.1 al 3.4.1.a.9) en el que se presentaba una diferencia significativa entre los genotipos, pero ésta respondía a un mayor desarrollo inicial de los testigos tolerantes, respecto a los susceptibles y, teniendo en cuenta también los resultados de las observaciones respecto al aspecto anatómico y estructural evaluados por microscopía (3.4.2.a.1), se decidió seguir trabajando con la FMH 490 o tolerante para las restantes extracciones de material correspondiente a la pared celular, debido a los rendimientos mayores en cualquier condición de salinidad.

Entonces, a partir de los residuos de las extracciones acuosas, se decidió trabajar con pooles, utilizando las tres replicas de cada tratamiento en el armado de cada pool (Cuadro 3).

#### **4.4.3.1.2. Estudio de los extractos obtenidos a partir de tallos.**

A continuación, se analizaron los resultados obtenidos en el proceso de extracción de los polisacáridos a partir de los tallos de la variedad de *L. tenuis* tolerante.

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
H2O S1	TT	14,3	33,1	4,9	ns	12,2	2,2	3,4	14,4	62,9
	D1T	22,0	20,2	6,6	ns	18,8	2,9	5,3	18,0	48,6
	D2T	21,9	27,9	4,5	ns	25,4	2,9	2,4	14,3	50,6
H2O S2	TT	16,3	35,4	6,3	ns	19,1	3,2	4,6	19,1	47,7
	D1T	16,7	27,9	5,3	ns	34,4	3,3	3,1	12,9	40,9
	TD2T	20,3	26,9	5,9	ns	34,5	3,5	2,7	11,2	42,4

Cuadro 4: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos acuosos 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TT), Dosis 1 tolerante (D1T) y Dosis 2 tolerante (D2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

El Cuadro 4 muestra el rendimiento y análisis de los dos extractos acuosos sucesivos obtenidos. Los detalles de los cálculos realizados para llegar a los resultados que se muestran se indican en la parte de Materiales y métodos 4.3.4.2. Estos cálculos se realizaron con el objeto de tener una visión lo más clara posible del tipo de polisacáridos presentes en función de las determinaciones realizadas. Por un lado, se pudo separar los monosacáridos provenientes de los polisacáridos de reserva de los que realmente son parte de la pared, y así, fue posible cuantificarlos.

Los polisacáridos de pared representaron sólo entre 35 y 20 % de la masa total obtenida. Se observó mayor o igual contenido de glucanos de reserva y menor contenido de pared en los extractos regados con soluciones salinas. Respecto a la composición en monosacáridos, se obtuvo en todos los casos un alto contenido en ácido galacturónico, proveniente de pectinas solubles. La presencia de ramnosa y cantidades importante de arabinosa y galactosa indicaron un elevado contenido de ramnogalacturonano I (RGI), además de homogalacturonano (HG) y pequeñas cantidades de posibles xilogalacturonanos y otros polímeros pécticos. La manosa podría provenir de pequeñas cantidades de mananos presentes, posiblemente de bajo peso molecular.

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
CDTA S1	TT	1,1	56,6	0,6	ns	7,2	0,2	ns	1,6	90,3
	D1T	2,3	45,3	1,4	0,1	6,4	0,3	0,3	3,8	87,2
	D2T	4,1	46,1	1,8	0,2	10,5	0,5	0,5	6,1	80,3
CDTA S2	TT	2,1	41,4	2,2	0,2	8,2	0,7	0,4	5,7	81,7
	D1T	5,0	34,1	3,5	0,4	16,2	0,7	0,6	9,5	69,1
	D2T	1,1	32,8	0,8	0,1	3,5	0,2	0,1	1,9	93,6

Cuadro 5: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de CDTA 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TT), Dosis 1 tolerante (D1T) y Dosis 2 tolerante (D2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Como era de esperar, la cantidad de polisacáridos de reserva disminuyó mucho en los extractos obtenidos con CDTA, (Cuadro 5). Estos estaban constituidos casi exclusivamente por homogalacturonanos, posiblemente con un bajo grado de esterificación con grupos metilo, dada su capacidad de ser extraídos con quelantes de calcio, como el CDTA. En consecuencia, el contenido en azúcares neutros fue mucho menor y podría provenir mayoritariamente de pequeñas cantidades de RGI. Se pudo ver que el porcentaje de polisacáridos de pared fue mucho menor en los extractos obtenidos de plantas que crecieron en condiciones de salinidad, es decir que en las plantas que crecieron en estas condiciones, la proporción de homogalacturonanos libres es menor.

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> S1	TT	1,1	69,5	2,2	0,4	6,7	1,4	0,3	4,3	84,8
	D1T	4,0	85,9	2,9	0,6	9,4	2,3	0,2	5,1	79,5
	D2T	ns	99,9	ns	ns	0,1	ns	ns	ns	100,0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> S2	TT	ns	59,0	ns	ns	ns	0,2	ns	ns	100,0
	D1T	1,4	57,9	1,2	0,2	4,6	3,1	0,1	1,9	89,0
	D2T	2,1	69,9	2,4	ns	10,8	7,3	ns	3,6	75,9

Cuadro 6: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos obtenidos con soluciones acuosas de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TT), Dosis 1 tolerante (D1T) y Dosis 2 tolerante (D2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Del análisis de los extractos obtenidos luego de las extracciones con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M, surgió que los monosacáridos neutros de pared se encontraban en muy baja proporción, mas aún, en el caso de D2T S1 y TT S2, casi 100% de los azúcares de pared celular eran ácidos urónicos, (Cuadro 6). El hecho de haber sido obtenidos con este solvente indicaría que los grupos carboxilo se encuentran mayoritariamente como metil ésteres.

Respecto a los ácidos urónicos determinados, 18,8 % correspondían a ácido glucurónico y 66,1 % a ácido galacturónico, esto indicaría la presencia que un porcentaje apreciable de polisacáridos diferentes de las pectinas (hemicelulosas solubles en soluciones alcalinas suaves).

A continuación, los residuos de la extracción con soluciones de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se sometieron a extracciones sucesivas en condiciones alcalinas más rigurosas.

Extracto	Dosis	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA
KOH 1M S1	TTT	100,0	1,0	ns	3,0	32,8	0,2	1,8	4,0	57,2
	TD1T	100,0	1,1	ns	3,4	45,6	ns	2,1	14,1	33,7
	TD2T	100,0	1,0	ns	3,9	45,8	ns	2,1	16,1	31,0
KOH 1M S2	TTT	100,0	1,6	ns	7,3	36,9	ns	3,8	5,3	45,1
	TD1T	100,0	2,1	0,4	12,2	11,8	ns	5,9	15,7	52,0
	TD2T	100,0	2,2	0,4	12,6	16,2	ns	5,4	17,5	45,8

Cuadro 7: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 1M 1 y 2 de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

En principio, se esperaba obtener las hemicelulosas con KOH 1M como solvente de extracción. Sin embargo, en este caso en los extractos con KOH 1M se encontraron aún cantidades importantes de pectinas (Cuadro 7). Con el objeto de determinar si los ácidos urónicos provenían de pectinas (GalA) o de hemicelulosas (GlcA), se recurrió a un método alternativo que permitió discriminar entre ambos ácidos urónicos.

Así, en la muestra TD1T se encontró 24,5% de ácido 4-*O*-metilglucurónico, 5,1% de ácido glucurónico y 3,9% de ácido galacturónico. En este caso, el ácido glucurónico provendría de glucuronoxilanos. Por otra parte, en este caso, no quedaron restos de  $\alpha$ -glucanos de reserva y la glucosa derivaría de xiloglucanos, que constituyen las hemicelulosas predominantes en este tipo de plantas. Los resultados obtenidos mostraron claramente un aumento en el contenido de éstos últimos en las plantas regadas con soluciones de NaCl en ambas extracciones sucesivas. En cambio, respecto a otros componentes extraídos ambos extractos no marcan igual tendencia.

Extracto	Dosis	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Gal A
KOH 4M S1	TTT	100,0	2,5	1,5	12,6	35,5	0,8	7,8	9,5	29,6
	TD1T	100,0	3,5	1,4	17,3	28,3	ns	7,4	7,4	34,6
	TD2T	100,0	3,9	1,4	19,3	22,6	0,2	7,0	11,1	34,5
KOH 4M S2	TTT	100,0	3,3	1,1	12,8	30,3	1,1	9,2	8,4	33,9
	TD1T	100,0	3,9	1,3	15,3	17,4	0,6	9,2	8,2	44,1
	TD2T	100,0	3,7	1,5	15,8	19,1	0,7	8,4	11,6	39,1
KOH 4M S3	TTT	100,0	3,0	1,2	11,4	17,0	0,7	8,9	6,8	51,1
	TD1T	100,0	3,3	1,7	16,0	17,5	0,2	7,8	9,3	44,1
	TD2T	100,0	2,1	0,9	18,0	17,7	0,1	6,5	4,0	50,6
Residuo Final (RF)	TTT	100,0	0,4	0,1	1,8	4,3	4,4	2,3	55,2	31,4
	TD1T	100,0	0,4	0,2	3,0	4,1	4,6	2,2	55,6	29,9
	TD2T	100,0	0,4	0,1	2,2	4,0	4,4	2,9	62,4	23,7

Cuadro 8: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 4M 1, 2 y 3 y el residuo final (RF) obtenido de los tallos de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

En primera instancia, se realizaron dos extracciones sucesivas con KOH 4M. Sin embargo, el residuo obtenido luego de la segunda extracción mostró un porcentaje de glucosa menor que 50% y más de 30% de ácidos urónicos. Por estos motivos, se realizó una tercera extracción con el mismo solvente, obteniendo valores de glucosa superiores a 55% y de urónicos menores que 31% (Cuadro 8).

En vista a estos resultados, con los solventes usados no fue posible la extracción exhaustiva de los polisacáridos de pared. Para completarla sería necesario utilizar otro tipo de solventes no acuosos, como por ejemplo LiCl 8,4% en dimetilsulfóxido, un solvente caotrópico de gran poder de extracción de los componentes mas fuertemente unidos a la estructura de las paredes celulares (Petrus et.al 1995).



#### 4.4.3.1.3. Extracciones de polisacáridos de la pared celular de hojas

Respecto a las observaciones sobre las extracciones realizadas sobre las hojas:

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
H2O S1	HTT	6,0	12,9	11,4	ns	12,0	3,6	2,7	10,1	57,5
	HD1T	10,3	14,2	11,9	ns	14,7	3,5	6,1	11,1	52,8
	HD2T	9,3	12,3	10,5	ns	21,0	3,4	2,5	9,6	53,0
H2O S2	HTT	11,9	17,9	18,0	ns	18,8	4,1	3,0	15,3	40,7
	HD1T	12,2	18,2	12,8	ns	24,9	6,8	4,1	11,4	40,0
	HD2T	11,9	17,5	13,2	ns	28,2	4,7	3,3	13,4	37,1

Cuadro 9: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos acuosos 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

En los extractos acuosos se obtuvieron pectinas solubles en agua con muy bajos rendimientos en cuanto al total de polisacáridos (Cuadro 9). En el primer extracto acuoso se observó una disminución en el contenido de ácidos urónicos en las muestras sometidas a estrés salino. Por otro lado, el segundo extracto acuoso no mostró diferencia en cuanto al contenido de ácido galacturónico, pero la composición en monosacáridos neutros varió principalmente en el contenido de arabinosa, lo que sugeriría una diferencia en las cadenas laterales de los ramnagalactouronanos I (RGI).

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
CDTA S1	HTT	2,0	41,9	2,2	0,6	8,6	1,6	0,4	4,7	81,8
	HD1T	4,3	50,6	1,5	0,5	8,0	1,3	0,4	3,7	84,6
	HD2T	2,7	57,1	0,3	0,2	4,4	0,7	0,2	2,2	92,7
CDTA S2	HTT	1,5	67,3	0,5	0,1	2,9	0,7	0,2	1,6	94,0
	HD1T	1,1	51,3	0,3	0,0	2,8	0,2	0,0	0,6	96,0
	HD2T	3,4	47,5	0,4	0,3	5,6	1,1	0,2	1,9	90,6

Cuadro 10: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos obtenidos con soluciones acuosas de CDTA 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Por extracción con CDTA, la masa de polisacáridos obtenidos aumentó notablemente respecto a la extracción acuosa, mientras que sólo se detectaron cantidades menores, casi despreciables, de polisacáridos de reserva (Cuadro 10). Al igual que en las extracciones de tallos con CDTA, predominan notablemente entre los monosacáridos, los ácidos urónicos, como era de esperar, superando, en muchos casos el 90%. Esto significa que los polisacáridos extraídos son mayoritariamente homolacturonanos, con predominio de ácidos carboxílicos libres.

Los porcentajes de azúcares neutros son muy bajos, por lo que es difícil detectar diferencias. En cambio, se observó un importante aumento del porcentaje de ácidos urónicos en el primer extracto en condiciones de alta salinidad (CDTA 1, HD2T).

Extracto	Dosis	$\alpha$ -glucanos %	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	GalA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> S1	HTT	2,7	48,0	3,1	1,3	17,5	4,6	0,3	8,2	65,1
	HD1T	3,6	45,9	2,8	0,4	22,5	2,0	ns	4,3	68,0
	HD2T	5,3	58,8	1,8	0,8	20,1	3,5	0,3	5,5	68,1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> S2	HTT	4,9	40,8	4,1	1,1	26,1	5,1	0,1	12,3	51,2
	HD1T	4,9	35,8	9,8	4,6	19,8	1,4	ns	4,2	60,1
	HD2T	11,7	52,8	3,0	2,2	18,1	3,3	1,0	8,4	64,0

Cuadro 11: Composición en  $\alpha$ -glucanos de reserva, polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (HTT), Dosis 1 tolerante (HD1T) y Dosis 2 tolerante (HD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Las pectinas extraídas de hojas con soluciones diluidas de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mostraron menor proporción de ácidos urónicos y una mayor proporción de cadenas laterales de arabinogalactanos, con predominio de arabinosa (Cuadro 11). En el primer extracto no se observaron diferencias importantes en función del contenido de NaCl en el agua de riego. En cambio, en el segundo se observó una disminución en el contenido de arabinosa y galactosa, que corresponden a los arabinogalactanos y un aumento en el contenido de ácidos urónicos. Estas diferencias podrían indicar pectinas con menor grado de

ramificación o con cadenas laterales mas cortas. A continuación, los residuos de la extracción con soluciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se sometieron a extracciones sucesivas en condiciones alcalinas más rigurosas.

Extracto	Dosis	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
KOH 1M S1	HTT	100,0	1,2	0,4	14,0	4,5	0,7	5,2	26,7	47,1
	HD1T	100,0	ns	ns	12,4	4,4	ns	2,8	52,2	28,2
	HD2T	100,0	0,7	ns	11,3	3,3	ns	3,4	39,6	41,8
KOH 1M S2	HTT	100,0	1,0	ns	13,8	6,5	ns	3,3	29,8	45,6
	HD1T	100,0	0,8	ns	11,3	2,8	ns	2,4	44,8	38,0
	HD2T	100,0	0,8	ns	9,3	3,4	ns	2,3	52,9	31,3

Cuadro 12: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 1M 1 y 2 de las hojas de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Los extractos obtenidos con KOH 1M a partir de tallos presentan importantes cantidades de xilosa, en cambio, en en las hojas la proporción de xilosa es mínima.

Extracto	Dosis	Polisac Pared totales %	Composición en monosacáridos (Moles %)							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA
KOH 4M S1	HTT	100,0	4,6	1,9	20,0	10,1	ns	5,4	10,3	47,4
	HD1T	100,0	2,1	1,2	15,1	6,4	ns	3,6	14,5	57,0
	HD2T	100,0	3,1	1,1	19,7	5,8	0,4	4,1	17,3	48,4
KOH 4M S2	HTT	100,0	3,2	1,6	12,5	8,1	ns	4,0	10,0	60,7
	HD1T	100,0	3,4	1,4	18,5	6,0	0,3	4,5	5,2	60,8
	HD2T	100,0	3,8	0,9	21,4	4,8	0,3	4,4	8,4	56,0
KOH 4M S3	HTT	100,0	3,6	1,9	15,2	10,1	ns	4,8	7,9	56,4
	HD1T	100,0	2,7	1,8	15,3	8,2	ns	3,9	13,5	54,6
	HD2T	100,0	3,0	1,8	12,5	8,0	0,2	5,3	11,6	57,4
Residuo final (RF)	HTT	100,0	0,5	0,3	4,2	3,1	6,9	2,6	54,9	27,5
	HD1T	100,0	0,7	0,4	4,2	3,2	6,1	2,4	57,1	25,4
	HD2T	100,0	0,7	0,3	4,7	3,0	5,9	2,7	52,6	30,1

Cuadro 13: Composición en polisacáridos totales de pared y en monosacáridos de los extractos de KOH 4 M 1, 2 y 3 y del residuo (RF) de las hojas de los testigos tolerantes (TTT), Dosis 1 tolerante (TD1T) y Dosis 2 tolerante (TD2T). Ver Apéndice en el que se muestran los valores experimentales obtenidos.

Al igual que con los tallos se realizaron dos extracciones sucesivas con KOH 4M, sin embargo, el residuo obtenido luego de la segunda extracción mostró un porcentaje de glucosa menor que 50% y más de 33 % de ácidos urónicos. Por estos motivos, se realizó una tercera extracción con el mismo solvente, obteniendo valores de glucosa superiores al 53% y de urónicos menores al 30% (Cuadros 8 y 13).

#### 4.4.3.2. Análisis de los resultados obtenidos a partir de la secuencia extractiva de los polisacáridos en relación a las determinaciones nutricionales realizadas sobre el residuo insoluble en alcohol (RIA).

Muestras	Polisacáridos solubles (g/kg)		Residuo final (g/kg)	Residuo RIA	
	De reserva	De pared celular		FDN (g/kg)	Cenizas (%)
Tallos					
TT	37	274	347	773	4
D1T	59	291	329	718	5
D2T	71	321	257	703	6
Hojas					
HTT	26	233	100	410	10
HD1T	40	221	109	374	10
HD2T	41	232	104	339	11

Cuadro 14. Comparación de los resultados obtenidos de masa de polisacáridos solubles obtenidos en la secuencia extractiva, el residuo final de extracción y el valor de FDN a partir del RIA para tallos y hojas de las plantas de *L. tenuis* testigo y sometidas a las Dosis 1 y Dosis 2 de sal en el agua de riego. Estos valores son aproximados y tienen un significado cualitativo.

Si bien los valores del Cuadro 14 son aproximados, se vió claramente que tanto en tallos, como en hojas, los valores de FDN sobre el RIA disminuyeron en las plantas sometidas a estrés salino, y que esta disminución se acentuó con el aumento en la concentración de sal en el agua de riego. Paralelamente, en tallos se observó un claro aumento en la masa de polisacáridos que se solubilizaron durante la secuencia extractiva, y que este aumento se produjo tanto para polisacáridos de pared celular, como para los polisacáridos de reserva. Por otro lado, la suma del total de polisacáridos soluble más el valor de FDN indicó que un valor < 10% de componentes del RIA se cuantificaron por ambas metodologías, estos componentes posiblemente correspondan a hemicelulosas que

se solubilizaron durante la secuencia extractiva, pero que fueron insolubles de detergente neutro.

Por otra parte, en hojas, el aumento en la proporción de polisacáridos solubles fue mínimo, por lo que en este caso no se puede considerar, además, la suma de los polisacáridos solubilizados durante el proceso extractivo y el valor de FDN, representan aproximadamente 60-70% del total del material del RIA. Esto implicaría que una parte importante de la masa de este residuo se perdió.

## 4.5 Discusión

Cuando se compararon las respuestas a la salinidad de los genotipos previamente clasificados como tolerante (FMH 490) y el susceptible (FMH 2241), respectivamente (Franco 2012), en el primer experimento se observó que presentaban un comportamiento similar frente al estrés salino. El tolerante presentó mayor desarrollo en todas las variables analizadas (biomasa de tallos y hojas, materia seca de tallos y hojas, biomasa de raíz, materia seca de raíz, longitud de los tallos, cantidad de ramificaciones), pero, al sufrir el estrés salino, los porcentajes de reducción fueron similares a los obtenidos en las plantas susceptibles. En el segundo experimento, se obtuvieron resultados similares al primero, no hubo diferencias significativas con respecto a la respuesta de ambos genotipos frente al estrés salino. Debido a que ambos genotipos respondieron de la misma manera frente al estrés salino, se utilizó sólo el genotipo 490 o tolerante para los análisis y estudios sobre las repuestas de las plantas a las condiciones de estrés, ya que, ante el comportamiento similar registrado, en caso de elegir una de estas dos FMH, se elegiría la que aportara mayor biomasa al pastoreo.

### 4.5.1 Consideraciones respecto a los parámetros nutricionales analizados

De acuerdo a lo publicado por Ben-Ghedalia et al (2001), trabajando con *Lolium multiflorum*, Lam., un aumento en la concentración de sal en el agua de riego se vio

asociado a una disminución en el contenido de FDN y un aumento en el contenido de hidratos de carbono solubles. Del mismo modo, una disminución en el contenido de materia orgánica se vio compensado por un aumento de la digestibilidad *in vitro* de la pared celular. Boga et al (2014), trabajando con biomasa aérea (tallos y hojas) de *Lotus corniculatus*, encontraron menores porcentajes de FDN y de FDA a medida que aumentaba el estrés salino, pero no encontraron diferencias significativas respecto a una baja o alta concentración de sal en el suelo. Por el contrario, estos autores encontraron diferencias significativas en dosis medias respecto a digestibilidad *in vitro*.

En este trabajo se han observado cambios significativos en los parámetros nutricionales producto del aumento en la salinidad. Estos cambios no han sido los mismos en tallos y hojas, que fueron los órganos estudiados. En tallos, se observó una importante disminución en FDN producto del estrés salino. Existe una relación negativa entre el contenido de FDN que es una medida de las paredes celulares vegetales (sin considerar a las pectinas) y el ritmo al que serán digeridas esas paredes celulares por los rumiantes. Esto implicaría un mayor contenido de hidratos de carbono fácilmente digeribles que redundará en un mayor consumo de esas especies en pastoreo (Mc Donald et al. 2006). Esta fracción de hidratos de carbono más solubles comprende hidratos de carbono de bajo peso molecular (reductores y no reductores), poli y oligosacáridos de reserva, pectinas y algunas hemicelulosas muy solubles (principalmente aquellas de bajo peso molecular). Se ha encontrado en trabajos previos, que carbohidratos, tales como azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) y almidón se acumulan bajo condición de estrés (Pesqueira 2009; Barbosa de Lima et al. 2014; Kerepesi y Galiba 2000; Khatkar y Kuhad 2000; Singh et al. 2000). Sin embargo, también hay antecedentes de especies en las cuales los carbohidratos disminuyen o se mantienen constantes cuando las plantas se exponen a salinidad (Parida y Das, 2005). Así, se ha reportado una disminución en el contenido de

almidón y un aumento en el contenido de azúcares de bajo peso molecular en hojas de *Bruguiera parviflora* (Parida et al. 2002), mientras que en hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), la síntesis de azúcares reductores y no reductores tuvo un comportamiento similar, mientras que el contenido de almidón se mantuvo constante (Gao et al. 1998). En estos trabajos no se tienen en cuenta las pectinas como un componente fundamental de la fracción de carbohidratos solubles en detergente neutro. En el caso de las hojas de *Lotus tenuis*, en este trabajo se observó una disminución del % de FDN para el caso de la Dosis 1 (75 mM NaCl) y no se detectaron cambios respecto a la Dosis 2 (150 mM NaCl), esto bien podría deberse a un comportamiento diferente en los distintos componentes solubles de las hojas frente al estrés salino. De hecho, el análisis químico realizado mostró que en el caso de los tallos hay un aumento, tanto en el contenido de polisacáridos de reserva, como en el contenido de pectinas, mientras que en las hojas se observó un aumento en el contenido de almidón, pero el contenido de pectinas se mantuvo aproximadamente constante.

Información adicional puede obtenerse de la determinación de FDN realizada sobre los residuos insolubles en alcohol. En este caso, los valores obtenidos son más altos a medida que aumenta el estrés, dado que el material inicial ya ha perdido componentes de bajo peso molecular, entre ellos, hidratos de carbono. Estos datos resultan de interés ya que el material soluble en detergente neutro, en este caso, correspondería sólo a almidón y pectinas, observándose, tanto para tallos (más pronunciada), como para hojas, una disminución del %FDN a medida que el estrés salino aumenta, que implica un aumento en el contenido de polisacáridos de fácil digestión. En este caso, los resultados del análisis nutricional y los de los análisis químicos muestran gran coherencia y este sería un ejemplo en el que el análisis químico aporta información para comprender el comportamiento nutricional.

Por otro lado, tanto en tallos, como en hojas se observó una disminución de FDA con el aumento en la salinidad. A partir de los valores de FDN y FDA, se puede inferir el contenido de hemicelulosas. Éstas se encuentran en proporciones apreciables en tallos y se observó una disminución sólo en el caso de la mayor dosis de sal agregada. Contrariamente, en hojas, el porcentaje de hemicelulosas en los testigos es mínimo, pero aumenta con el agregado de sal. En cuanto al % de lignina, en tallos es mayor, como era de esperar, dado el mayor contenido en sistemas de conducción, altamente lignificados. Es notable que, contrariamente a lo esperado, en los tallos no se observaron diferencias importantes en el contenido de lignina con el incremento de sal, más aún, en las hojas, se detectó una disminución en este parámetro, contrariamente a lo esperado, ya que en varias publicaciones se ha reportado un incremento en el grosor de las células vasculares, siendo este efecto dependiente de la concentración de sal (Christensen *et al.*, 1998). El estrés salino se ha asociado a un aumento en la deposición de lignina en el sistema vascular y/o un mayor desarrollo del xilema, esto se ha demostrado, por ejemplo en tallos de soja; en este estudio en particular, los autores concluyeron que el estrés salino produciría una disminución en el crecimiento producto, en parte de los cambios en la estructura del xilema de los tallos, producto de la mayor lignificación de los mismos (Dolatabadian 2011).

Por otra parte, se observó, tanto en tallos, como en hojas, una disminución en el contenido de celulosa y mayor digestibilidad *in vitro* a las 48 hs, a medida que aumentaba el estrés. Cabe destacar que la producción de gas de los tallos que sufrieron el estrés más severo, tuvieron una mayor tasa de producción de gas en las primeras 18 hs. Estos resultados en conjunto sugieren que, si bien el estrés salino produce una pérdida en el rendimiento del cultivo (ver Capítulo 3), la digestibilidad del mismo para rumiantes podría ser mayor contrariamente a lo esperado.



#### 4.5.2 Consideraciones respecto a los parámetros hormonales analizados

Las respuestas de defensa de los vegetales frente a los distintos tipos de estrés tienen lugar, en un primer momento, en la célula afectada y en las células vecinas, pero para el vegetal es ventajoso generar defensas que lleguen a otras partes de la planta, que se pueden ver afectadas, produciendo una respuesta sistémica que se encuentra regulada por la interacción cruzada de distintas hormonas. Varios autores coinciden en reconocer al ácido abscísico como la hormona primaria en la generación de respuestas frente al estrés salino, aumentando su concentración y degradándose cuando finaliza este estrés (Raghavendra et al. 2010; Cutler et al. 2010; Danquah et al. 2013). Esta hormona promueve el cierre de estomas para evitar la pérdida de agua, disminuyendo la tasa de transpiración, pero afectando también la asimilación de CO<sub>2</sub> necesario para la fotosíntesis (Cabot et al. 2014). Esto puede producir disminución del crecimiento coincidente con las respuestas encontradas en nuestro experimento. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el contenido de esta fitohormona. El ácido salicílico y los jasmonatos (JA, JA-Ile y OPDA), si bien relacionados, en un principio, solamente con la respuesta vegetal frente a los estreses bióticos (Wasternack, 2007; An and Mou, 2011), cumplen un rol en las respuestas frente al estrés salino. La forma Ja-Iso, que es la forma activa del ácido jasmónico, fue la única en la que se encontró respuesta frente al estrés salino y solamente frente a la dosis mas alta de sal en el agua de riego; en este caso se observó una reducción. En cambio, no se encontró respuesta debida al JA, OPDA, SA e indolacético. Si bien en este trabajo se observaron respuestas frente al estrés salino respecto a parámetros de crecimiento (biomasa de los tallos, las hojas y las raíces, longitud de los tallos y de la raíz, número de ramificaciones), a parámetros anatómico-estructurales como cierre de estomas, no se encontraron cambios en las concentraciones de las hormonas que podrían ser las responsables de esas alteraciones. Este hecho podría deberse, quizás, a la pérdida

de las mismas durante la conservación del material en el freezer a -20°C durante tres años, hasta que se pudieron realizar las determinaciones químicas hormonales.

### **4.5.3 Consideraciones respecto a los estudios de polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas**

#### **4.5.3.1 Comparación entre los polisacáridos de paredes celulares de tallos y hojas.**

En este trabajo se realizó la extracción secuencial de los polisacáridos de paredes celulares de hojas y tallos de *L. tenuis* en un estado de desarrollo correspondiente al momento en que comienza la floración. Los extractos obtenidos corresponden a una mezcla de tejidos, en donde a excepción de los tejidos de conducción, predominan los tejidos en desarrollo y las paredes celulares primarias. Es decir, que en los extractos obtenidos, los polisacáridos tienen mayormente este origen, ya que las paredes secundarias tienen mayoritariamente celulosa y lignina, insolubles en todos los solventes utilizados; la excepción serían los glucuronoxilanos de paredes secundaria (ver mas abajo). De hecho, las grandes cantidades de pectinas aisladas en todos los extractos, que incluso quedaron en parte retenidas en los residuos finales de extracción, corresponden a paredes celulares en desarrollo.

Si se compara el total de material solubilizado durante el proceso extractivo, se ven grandes diferencias entre tallos y hojas. Como era de esperar, la proporción de material solubilizado por este proceso en el caso de los tallos fue mucho menor, aproximadamente la mitad que en hojas, respecto al material inicial seco (42,5% y 82,2%, respectivamente, estos valores pasan a 40,3% y 80,9%, luego de descontar los glucanos de reserva que durante el proceso extractivo se obtuvieron con los polisacáridos de pared). Esto coincide con los resultados obtenidos de los valores nutricionales: (55,7% FDN y 43,3% FDA) para los tallos(testigo) que indica un 44,3% de solubles en detergente neutro y un 55,7% soluble en detergente ácido. Respecto a las hojas (testigo): (16,9 FDN y

15,5% FDA), se obtuvieron 83,1% de solubles en detergente neutro y un 84,5% de solubles en detergente ácidos.

En ambos órganos, los primeros extractos presentaron porcentajes relativamente bajos de polisacáridos de pared celular, principalmente los extractos acuosos y esto se acentúa en el caso de las hojas. En cuanto a los extractos acuosos, la composición en monosacáridos mostró que las pectinas más solubles tendrían una alta proporción de ramnogalacturonano I (RGI), principalmente en el caso de las hojas (relación molar Rha:UA, en hojas ~1:5 y 1:2, para el primer y segundo extracto acuoso, respectivamente; en cambio, en tallos, ~1:13 y 1:8, además de altos porcentajes de Ara y Gal).

Los extractos obtenidos con soluciones de CDTA y carbonato de sodio son los que tradicionalmente se consideran correspondientes a pectinas, con las soluciones de CDTA, se produce la extracción de pectinas unidas a la pared celular por enlaces iónicos, mientras que con soluciones de carbonato de sodio se extraen las pectinas unidas por enlaces más fuertes (Albersheim et al. 2011). En este trabajo, los extractos obtenidos a partir de paredes celulares de tallos tenían en todos los casos entre 80 y 100% de ácidos urónicos. Para el primer extracto obtenido con soluciones de CDTA y para el primero obtenido con soluciones de carbonato, se determinó que se trataba de ácido galacturónico, confirmando su correspondencia a pectinas. Esto implica que estas fracciones estaban constituidas por homogalacturonanos y su comportamiento diferente frente a los solventes de extracción dependería del grado de esterificación de los ácidos carboxílicos con metilos y de la consecuente capacidad de estas moléculas de formar interacciones con  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, los extractos obtenidos con soluciones de CDTA a partir de hojas resultaron bastante similares a los de tallos, mientras que los obtenidos con soluciones de carbonato de sodio presentaron porcentajes menores de ácidos urónicos; teniendo en cuenta la composición en azúcares neutros de estos últimos extractos, se infiere que habría una alta proporción

de RGI con mayor grado de ramificación (o cadenas de arabinogalactanos de mayor longitud).

Los siguientes extractos están constituidos exclusivamente por polisacáridos (dentro de los límites de detección de las técnicas utilizadas), esto es lógico, ya que las proteínas solubles se obtendrían en los primeros extractos de esta secuencia extractiva. El análisis de los monosacáridos constituyentes mostró importantes diferencias entre tallos y hojas. Si bien en los tallos se determinó una alta proporción de ácidos urónicos, el análisis de los mismos indicó mayor proporción de ácido 4-O-metilglucurónico y ácido glucurónico, respecto a ácido galacturónico (relación molar 4MeGlcA:GlcA:GalA 10:2:2 para KOH1MS1). A partir de este resultado, teniendo en cuenta el alto contenido de xilosa en estos extractos, se dedujo que en los mismos se encontraban grandes proporciones de glucuronoxilanos, hemicelulosas provenientes de paredes celulares secundarias. El bajo contenido de glucosa en estas mismas fracciones, que derivaría de xiloglucanos de paredes primarias, confirma esta aseveración. Por otro lado, menores cantidades de pectinas se evidenciaron por la presencia de ácido galacturónico, Rha, Ara y Gal.

En cambio, en los extractos fuertemente alcalinos provenientes de las hojas, el contenido de xilosa es mucho menor; este hecho, sumado al contenido más elevado de glucosa, indicó predominio de xiloglucanos como hemicelulosas y mayores proporciones de pectinas que en los tallos. Es de destacar la alta proporción de polisacáridos pécticos que se extrajeron en condiciones alcalinas a partir de las hojas.

El análisis químico detallado explica cualitativamente los resultados obtenidos a partir de las metodologías clásicas de determinación de los parámetros nutricionales:

- 1) La enorme diferencia entre %FDN entre tallos y hojas se debería, principalmente, al mayor contenido de pectinas en éstas últimas, aunque dentro de los componentes solubles en detergente neutro habría además monosacáridos, oligo- y

polisacáridos de reserva. En la secuencia extractiva realizada, se determinaron los valores aproximados de  $\alpha$ -glucanos que se obtuvieron en los primeros extractos, con un total de 2,2% del material vegetal para tallos y 1,3%, en hojas.

2) La diferencia en el contenido de hemicelulosas posiblemente se deba a la considerable proporción de glucuronoxilanos provenientes de paredes secundarias detectadas en tallos.

3) Los porcentajes de celulosa estimados a partir de los parámetros nutricionales son del mismo orden del residuo final de la secuencia extractiva, tanto para tallos, como para hojas. Esto indicaría que en realidad en lo que se toma por “celulosa” por medio de estas metodologías comprende a lo sumo 55-56% de celulosa, el resto estaría constituido por otros polisacáridos, ricos en ácidos urónicos, que no pudieron solubilizarse a pesar de haber realizado 3 extracciones sucesivas con soluciones de KOH 4M.

#### 4.6 Conclusiones

Debido a que *Lotus tenuis* es una especie forrajera, la correcta caracterización de sus paredes celulares de tallos y hojas constituye una herramienta fundamental en el armado de las raciones de rumiantes en pastoreo. Es por ello que para evaluar si existían cambios a nivel de pared celular debidos al estrés salino, se consideraron distintas metodologías de análisis a utilizar observando su complementariedad y diferencias.

Por una parte se utilizó el sistema de detergentes de Van Soest con el apoyo de la determinación de producción de gas y de digestibilidad *in vitro* a las 48 hs.

En base a estas determinaciones, se observó que en tallos, al incrementar la sal en el agua de riego disminuía el contenido de FDN, de FDA, de celulosa y de hemicelulosas. También, se observó el aumento de la digestibilidad *in vitro* a medida que el estrés se hizo mas severo y se mantuvo sin cambios el porcentaje de lignina para estas condiciones experimentales.

Respecto a las hojas, se observaron cambios en el contenido de FDN solamente respecto a la dosis de 75mM de NaCl en el agua de riego; en cambio el contenido de FDA y de celulosa disminuyó con respecto a los testigos, aunque las hemicelulosas aumentaron frente a estrés. También, se observó un aumento en la digestibilidad *in vitro*.

Si bien se encontraron diferencias entre tallos y hojas, los resultados nos llevaron a pensar, sumados a los encontrados en el Capítulo 3 que, si bien las plantas frente al estrés salino crecieron menos, sus paredes celulares serían más digestibles (menor % de FDA y mayor digestibilidad *in vitro*) y tendrían un mayor consumo voluntario (menor % de FDN).

Para describir con mayor exactitud los cambios a nivel de la pared celular, se utilizaron otras mediciones químicas más específicas que, complementando las mediciones anteriores, permitieron observar estructuralmente y cualitativamente donde se producían los efectos debidos al estrés salino, encontrando un aumento en los polisacáridos de reserva, tanto a nivel de los tallos, como de las hojas y, en menor grado, un aumento de polisacáridos de pared en los tallos.

Si bien se encontraron pocas diferencias respecto a la acción moduladora de las hormonas medidas en este experimento, tal como se mencionó en la discusión, deberíamos mejorar las condiciones de preservación del material antes de realizar las mediciones, por ejemplo guardando el material en freezer a -80°C.

## **5 Capítulo 5 Respuestas químicas de la pared celular frente al estrés biótico producido por trips y las respuestas hormonales y nutricionales asociadas**

### **5.1 Introducción**

Las plantas fijan la energía solar gracias a la fotosíntesis, cumpliendo un rol fundamental en el mantenimiento de la vida en la Tierra. Producen la mayor proporción de biomasa en los ecosistemas terrestres y constituyen la base de la alimentación de los organismos herbívoros. En particular, los insectos herbívoros han desarrollado distintas estrategias de alimentación para obtener nutrientes de sus plantas huésped, interactuando con las plantas por más de 400 millones de años. Ambos han evolucionado desarrollando un gran número de mecanismos de defensa, para asegurar su subsistencia y persistencia. Las plantas no actúan como víctimas pasivas, sino que responden a la herbivoría en forma activa mediante variados mecanismos de defensa, que pueden ser directos o indirectos. La producción de toxinas y de compuestos proteicos por parte de la planta, que buscan afectar procesos fisiológicos del insecto o inhibir su ataque (repelencia), son mecanismos directos. Dentro de los indirectos, cabe mencionar la emisión de compuestos volátiles que buscan atraer enemigos naturales de la plaga (predadores o parásitos), entre otros (Howe y Jander 2008; Züst y Agrawal 2017; Zamioudis y Pieterse 2012; Dicke y Baldwin 2010).

Los mecanismos de defensa en las plantas dañadas por los herbívoros se inducen luego de reconocer la presencia del herbívoro a partir de patrones moleculares asociados al daño mecánico (DAMPs) (Duran-Flores y Heil 2016, Howe y Jander 2008, Jones y Dangl 2006), asociados al herbívoro agresor (HAMPs) (Mithöfer y Boland 2008) y relacionados con las secreciones orales de los insectos. La saliva de los insectos herbívoros está conformada por compuestos químicamente modificados por estos al alimentarse (Hogenhout y Bos 2011; Howe y Jander 2008; Wu y Baldwin 2010) o por patrones asociados a la oviposición (Hilker y Fatouros 2016).

Una vez que la planta ha reconocido el daño por herbivoría, se inicia una cascada de señalización en las células vegetales, que inicia la biosíntesis especializada de metabolitos y proteínas. Las hormonas vegetales cumplen un papel clave en la regulación y señalización del sistema inmune vegetal. Así como en los organismos animales, originalmente, se asociaban las hormonas solamente a funciones reguladoras del crecimiento y desarrollo de los individuos, sin embargo actualmente, se encuentra plenamente comprobado el rol de las fitohormonas, ácido salicílico (SA) y ácido jasmonico (JA) y sus derivados, en los mecanismos de defensa vegetales (Zavala 2006; Browse 2009; Vlot et al. 2009; Schuman y Baldwin 2016; Dillon et al. 2018). Por otra parte, otras hormonas, como etileno (ET) (Van Loon et al. 2006), ácido abscísico (ABA) (Ton et al. 2009), giberelinas (Navarro et al. 2008), auxinas (Kazan y Manners 2009), citoquininas (Walters y McRoberts 2006) y brasinoesteroides (Nakashita et al. 2003), funcionan como moduladores del entramado de la red de respuestas inmunes. Un cambio en la sensibilidad o en la concentración de las hormonas debido a la interacción con el herbívoro genera un grupo de respuestas adaptativas del vegetal, que muchas veces lleva aparejado un menor crecimiento y desarrollo de la planta dañada, junto con cambios en la composición de las paredes celulares (ver Introducción, sección 1) (Walters y Heil 2007; Hematy 2009). La composición y momento de la liberación de las hormonas determinarán una mayor susceptibilidad al ataque de los insectos herbívoros (Howe y Jander 2008; Wu y Baldwin 2010). Además, distintas hormonas interaccionan produciendo efectos antagónicos o sinérgicos, que determinarán otro nivel de regulación del sistema inmune vegetal.

Actualmente, existe evidencia que prueba que algunos herbívoros secretan efectores en su saliva, que modulan respuestas de defensa de las plantas hospedantes (Hogenhout y Bos 2011; Kant et al. 2015; Giron et al. 2016).



Existe información respecto a las respuestas inducidas activadas por la herbivoría de insectos masticadores o chupadores (floem-feeding) (Bonaventure 2012; Hilker y Fatouros 2016; Züst y Agrawal 2016), habiéndose identificado varios HAMPs (Douglas 2018), elicitores respecto a deposición de huevos y efectores de origen proteico (Hogenhout y Bos, 2011; Douglas 2018), pero no ocurre lo mismo en el caso de otros insectos, como los trips.

Los trips, al alimentarse, activan la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), que, a su vez, induce las defensas de la planta frente a los trips (Dillon et al. 2018). No se han encontrado aún DAMPs o HAMPs específicos para los trips en los lugares de interacción planta-trips. Del mismo modo, no se han identificado proteínas efectoras o proteínas de resistencia en las plantas. Tampoco se ha observado que los huevos de los trips contengan factores asociados a oviposición (EACs) que sean reconocidos por la planta y que induzcan la síntesis de SA. Sí, se ha encontrado la generación de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) específicos, liberados por las plantas frente al ataque de trips, que atraen insectos predadores que se alimentan de ellos. En la Figura 72 se indican con líneas de puntos los receptores hipotéticos en células vegetales y los caminos de respuestas inducidas, no caracterizadas aún frente a un ataque de trips (Steenbergen et al 2018).

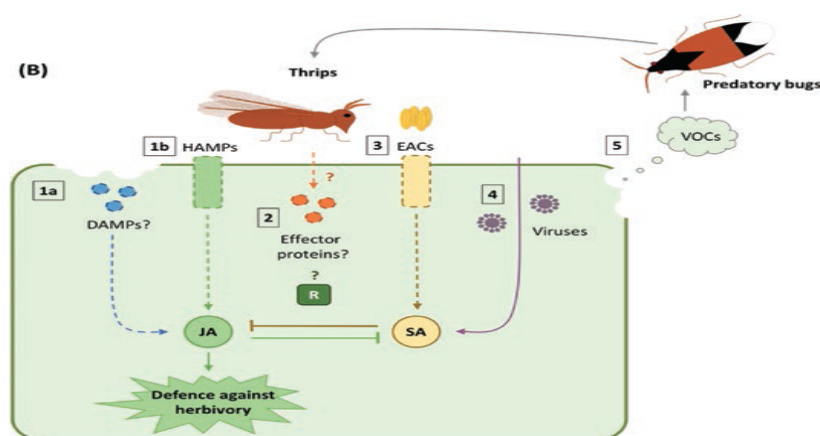


Figura 72: Esquema de los componentes moleculares inducidos como respuesta a la herbivoría producida por trips (Steenbergen et al 2018).

Para determinar los cambios químicos de las paredes celulares de *Lotus tenuis* frente a un estrés biótico, se decidió utilizar a los trips como herbívoros capaces de inducir respuestas defensivas en las plantas. Estos insectos poseen un aparato bucal asimétrico (con una sola mandíbula desarrollada) raedor – chupador, con el cual raen y laceran la superficie del vegetal y luego succionan los jugos celulares derramados con los estiletes maxilares, por lo que se alimentan fundamentalmente del contenido celular, dejando casi intactas las paredes celulares, que constituyen el objeto de investigación en este trabajo.

## **5.2 Objetivos:**

### **5.2.1 Objetivos específicos**

1. Caracterizar la composición química y estructural de las paredes celulares de hojas de *L. tenuis* en estado vegetativo respecto al estrés biótico producido por trips.
2. Determinar el contenido de las fitohormonas de defensa, ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS), ácido jasmónico-isoleucina, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido indol acético y ácido abscísico frente a las condiciones de estrés biótico producido por trips.
3. Observar la complementariedad y diferencias entre las metodologías de FDN, FDA, y los métodos más específicos de laboratorio, para la caracterización de los componentes de las paredes celulares por extracción secuencial de los mismos y su análisis por métodos espectrofotométricos y la determinación de monosacáridos constituyentes por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa por impacto electrónico.

### **5.2.2 Hipótesis de trabajo:**

H3) Los cambios morfológicos y químicos de las paredes celulares de *L. tenuis* debidos a la herbivoría afectan la calidad nutricional de las hojas de las plantas en estado vegetativo, afectando su digestibilidad potencial.

- c. La herbivoría producida por insectos afectan negativamente la digestibilidad de las hojas de *L. tenuis* por un aumento en la concentración de celulosa y lignina y una disminución en el contenido de pectinas.
- d. El ácido jasmónico y el ácido salicílico tienen una función moduladora en los cambios químicos de la pared producidos por estrés biótico (herbivoría). Un aumento en la concentración de estas fitohormonas podría regular los cambios químicos de la pared.
- e. La complementariedad de los análisis efectuados permitirá explicar con mayor exactitud los cambios encontrados a nivel de pared celular debido al estrés salino y al estrés biótico.

### 5.3 Materiales y métodos:

De acuerdo a lo presentado en el Capítulo 2 Materiales y métodos, para evaluar el efecto del estrés biótico producido por trips sobre plantas de *L. tenuis*, se realizó un experimento con 100 plantas de esta especie bajo invernáculo. Las mismas provienen de semillas de la familia tolerante (FMH 490) de la estación experimental INTA Pergamino. Las plántulas logradas se colocaron en bandejas de germinación con un sustrato de compost orgánico y perlita con suministro de 24 hs de luz artificial (400 W) y riego diario por aspersión manual con agua corriente. Cuando las raíces fueron visibles bajo las bandejas, éstas se llevaron al invernáculo, y, dos días después, las plántulas fueron transplantadas a macetas de 20 cm de diámetro y 2,56 l de capacidad, previamente preparadas con un sustrato de compost orgánico (Bertinat) y perlita (4:1). Se colocaron 5 plántulas por cada maceta y se dispusieron 5 macetas por cada bandeja. Se trabajó con 20 macetas con 5 plantas cada una. Cada una de las 100 plantas obtenidas fue cubierta con una malla fina de tul (carpas) para evitar el ataque inespecífico de insectos. El riego se hizo con agua corriente, día por medio, manteniendo la capacidad de campo. En el mes

de noviembre, cuando las plantas presentaban un buen desarrollo y antes que comenzara la floración, se las dividió en dos grupos, unas serían las testigo y otras, las atacadas. Cada tratamiento fue dividido al azar en tres para trabajar con tres réplicas, que se colocaron en bandejas diferentes. Se cubrieron nuevamente todas las plantas, pero, esta vez en forma independiente, todas las atacadas, juntas, y todas las testigo, juntas, con una malla fina de tul. Para evaluar el impacto del estrés biótico sobre las paredes celulares de *Lotus tenuis*, se utilizaron trips, *Caliothrips phaseoli*. A las plantas identificadas como atacadas se le fueron colocando trips a razón de 25 trips durante 4 días. A la semana siguiente, se agregaron 30 trips más, ya que no se evidenciaba un gran ataque significativo (Figura 73).



Figura 73: Esquema del experimento realizado para evaluar el efecto del estrés biótico producido por *Caliothrips phaseoli* en plantas de *Lotus tenuis* bajo invernáculo. Imágenes a-d: Caja de Petri con semillas sobre el papel de filtro; b: bandejas de germinación; c: Bandejas con las macetas bajo la carpa de tul; d: aspecto general de las plantas.

Al comenzar la floración, se dio por concluido el experimento. Se llevaron las plantas al laboratorio, se separó la biomasa aérea y se determinó su peso. Se obtuvieron las muestras de hojas de las plantas atacadas y las plantas testigo para la determinación de las fitohormonas relacionadas con las defensas de las plantas manteniéndolas en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su liofilizado previo a su medición.

Se determinó porcentaje de materia seca de tallos y hojas por secado a 65°C en estufa a aire forzado, hasta que no se detectó variación en el peso. Se separaron tallos y hojas. Sobre el material seco y molido de la totalidad de las hojas de las plantas testigo por un lado y de las atacadas por otro, se midieron variables nutricionales y se extrajeron los polisacáridos de pared, del mismo modo, que para las mediciones referidas al estrés salino (Ver Capítulo 2 Materiales y métodos).

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Estudios de parámetros nutricionales

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las determinaciones de fibra detergente neutro y ácido, celulosas y hemicelulosas sobre las plantas atacadas por *Caliothrips phaseoli* y las plantas testigo.

Respecto a los % de fibra detergente neutro ( $p=0,2$ ), y fibra detergente ácido ( $p=0,4$ ) evaluados, no se encontraron diferencias significativas frente al estrés biótico producido por trips (Figura 74).

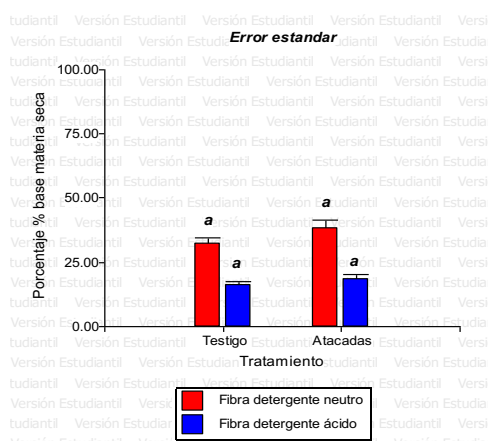


Figura 74: Porcentaje de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido en respuesta al estrés biótico producido por trips, determinados por el sistema de detergentes de Van Soest. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las plantas atacadas y las plantas testigo respecto al contenido de hemicelulosas ( $p=0,1$ ), celulosa ( $p=0,2$ ) y lignina ( $p=0,5$ ), (Figura 75).

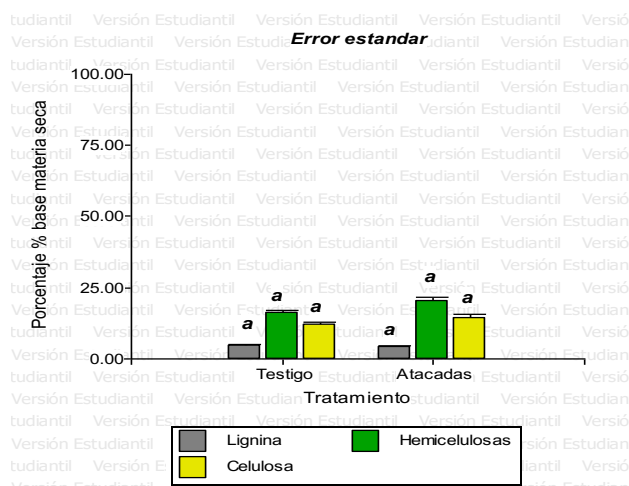


Figura 75: Porcentaje de lignina, hemicelulosas y celulosa en respuesta al estrés biótico producido por trips determinado por el sistema de detergentes de Van Soest. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

#### 5.4.2 Estudio de parámetros hormonales

De acuerdo a lo presentado en la Introducción 1.4, las condiciones de estrés biótico, como la herbivoría producida por insectos u otros animales, generan una serie de respuestas a nivel vegetal que dependerán del bioagresor y de mecanismos de activación directos e indirectos, que incluyen la síntesis hormonal y la síntesis de metabolitos secundarios. Las fitohormonas funcionan como moduladores del entramado de la red de respuestas inmunes. Es por esto, que se realizaron las mediciones de las concentraciones hormonales en hojas de ácido salicílico (SA), de los jasmonatos (JA, JA-Ile, OPDA), ácido indol-acético (IAA) y ácido abscísico (ABA).

La concentración de ácido salicílico no mostró diferencias significativas entre las plantas testigo y las que sufrieron el estrés biótico por el daño de los trips ( $p=0,16$ ), a diferencia de lo observado en la concentración del ácido jasmónico para el cual sí se

encontraron diferencias significativas ( $p=0,01$ ). La concentración de JA aumentó 210,0% frente a la herbivoría (Figura 76).

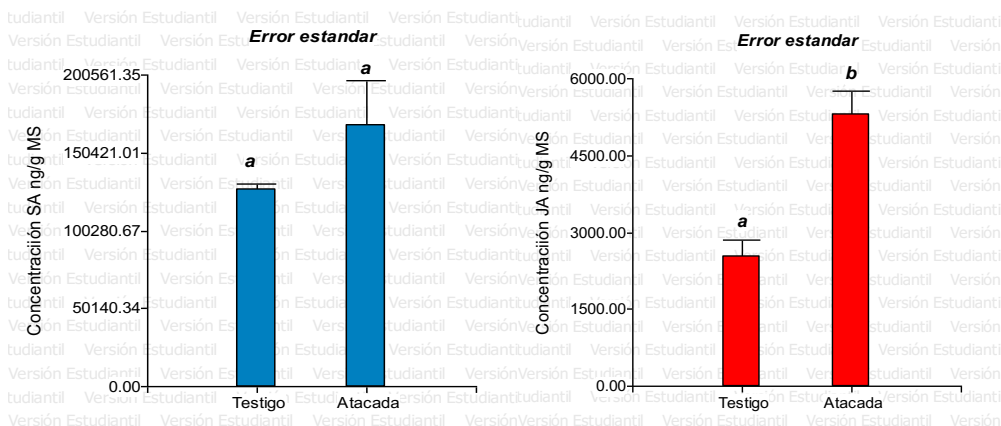


Figura 76: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

La concentración de ácido jasmónico - isoleucina en las muestras de hojas aumentó 449,5% (Media Atacadas: 325,0 ng/g MS) respecto a las testigo (Media testigo: 78,31 ng/g MS), ( $p=0,08$ ), (Figura 77). En cambio, no se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA ( $p=0,75$ ), entre las plantas atacadas y las testigo (Figura 77).

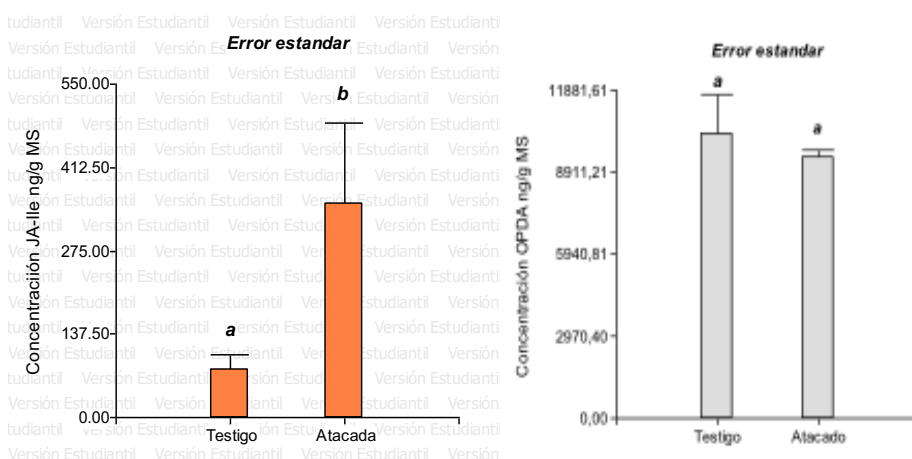


Figura 77: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de ácido jasmónico - isoleucina y ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

Por último, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de ácido indol-acético ( $p=0,5467$ ) entre las plantas atacadas y las testigo, mientras que el estrés

biótico disminuyó la concentración del ácido abscísico ( $p=0,0929$ ) 72,6% en los tejidos vegetales (Figura 78).

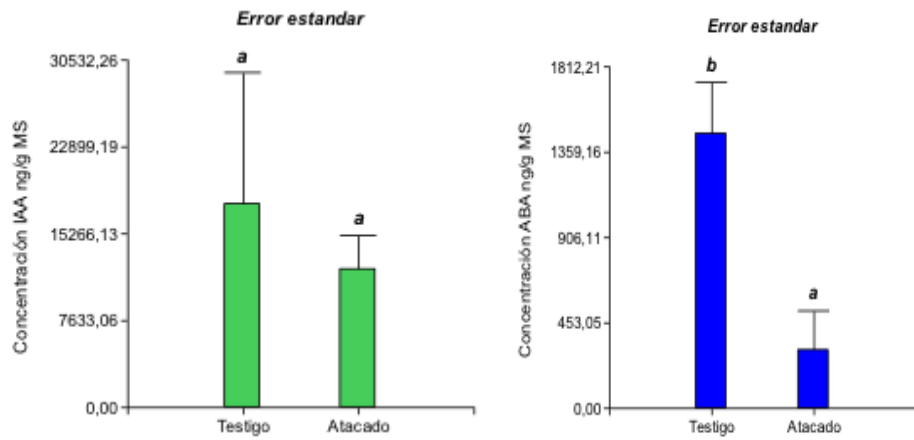


Figura 78: Cuantificación hormonal en respuesta al estrés biótico producido por trips. Concentración de ácido indol-acético y ácido abscísico en ng/g MS en las plantas atacadas y en las plantas testigo de *Lotus tenuis*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

### 5.4.3 Resultados de los estudios de polisacáridos de paredes celulares de hojas

#### 5.4.3.1 Porcentajes de polisacáridos de paredes celulares en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva.

A.

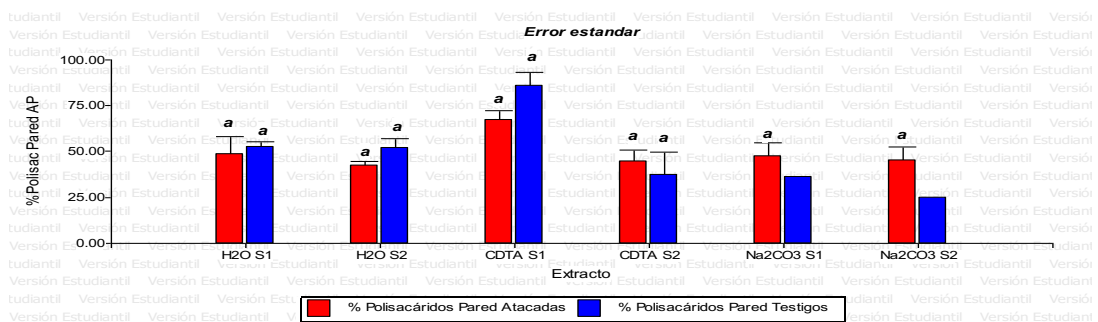


Figura 79 A: Porcentajes de polisacáridos de paredes celulares de hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. A. Extractos obtenidos con: agua caliente, soluciones de CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).



B.

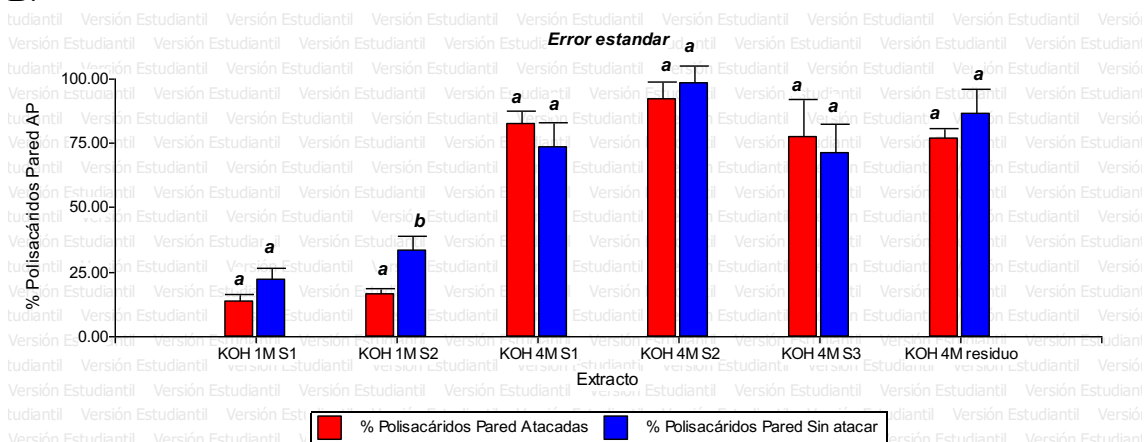


Figura B: Porcentajes de polisacáridos de paredes celulares de hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. B. Soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y residuo final (RF). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Con respecto al porcentaje de polisacáridos de pared obtenidos durante la secuencia extractiva, si bien no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,6$ ) para las secuencias de H<sub>2</sub>O, CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y tampoco en las de KOH 1M S1 y 4M ( $p=0,35$ ), se encontraron diferencias significativas en el extracto KOH 1M S2 ( $p=0,01$ ), presentando la media de las plantas atacadas 39,4% menos polisacáridos en sus paredes celulares, respecto a las testigo.

Si bien no se observaron diferencias significativas, salvo para el extracto KOH 1M S2, se observó una disminución en los rendimientos en las primeras extracciones que corresponden principalmente a polisacáridos pécticos (H<sub>2</sub>OS1, H<sub>2</sub>OS2 y CDTAS1), de mayor digestibilidad, mientras que en los últimos (CDTAS2, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>S1 y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>S2), esta tendencia se revirtió (Figura 79 A). Una tendencia similar se observó para el caso de los extractos correspondientes a hemicelulosas más fácilmente extraíbles (KOH1MS1), mientras que en el caso de los polisacáridos más fuertemente unidos a la estructura de la pared, no se observó una tendencia definida (Figura 79 B).

### 5.4.3.2 Composición de los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva.

Como se mostró para la extracción secuencial de los polisacáridos en el experimento de estrés salino, el análisis de la composición en monosacáridos de los primeros extractos muestra cierto contenido de glucosa, principalmente, los extractos acuosos. En este caso, la glucosa provenía de polisacáridos de reserva ( $\alpha$ -glucanos).

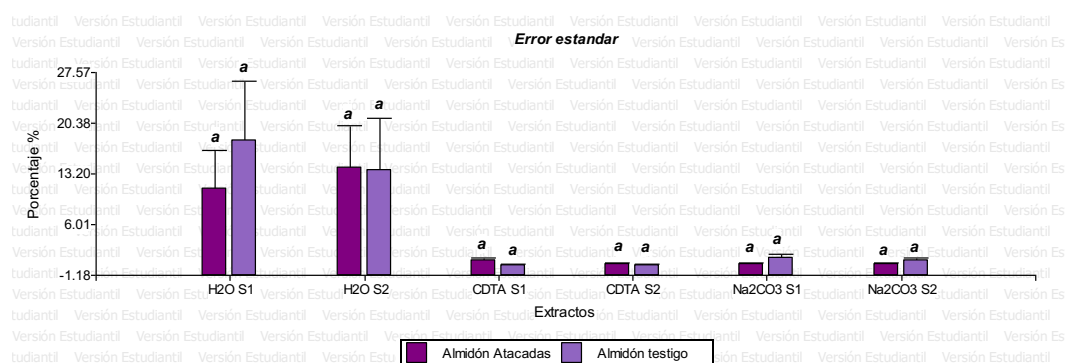


Figura 80: Porcentajes de polisacáridos de reserva (almidón) en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva de las hojas utilizando agua caliente, CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Respecto a los polisacáridos de reserva, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,6$ ) para las secuencias de extracción con agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Figura 80).

A.

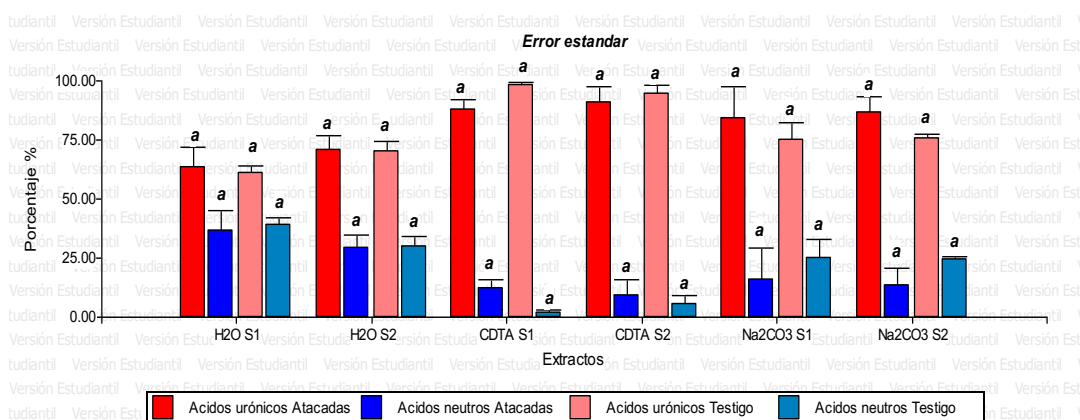


Figura 81: Porcentajes de monosacáridos neutros y ácidos urónicos en hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. A. Extractos obtenidos con: agua caliente, soluciones de CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

B.

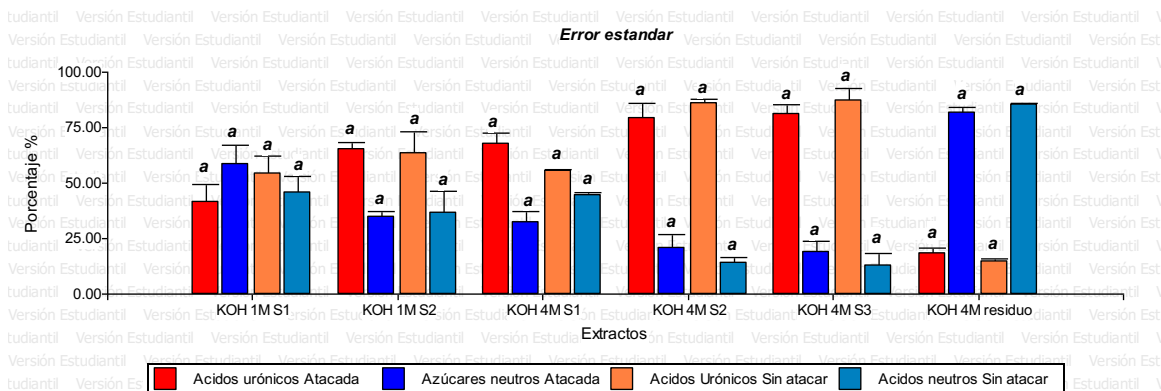
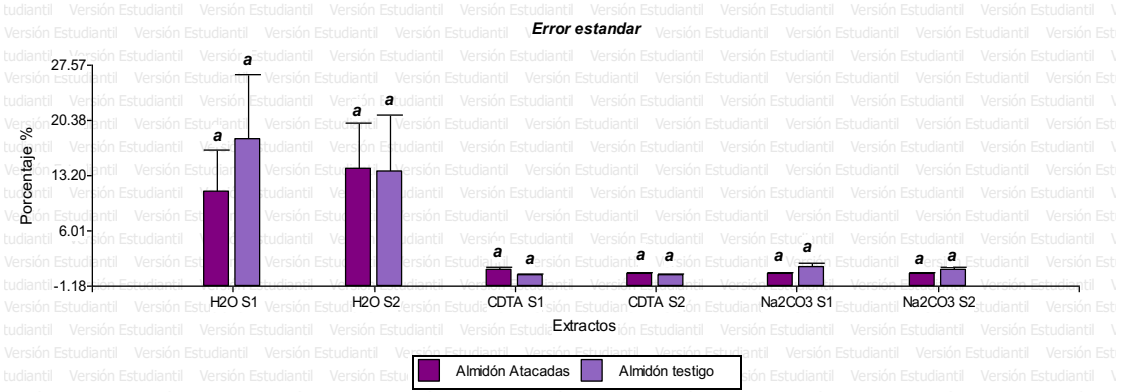


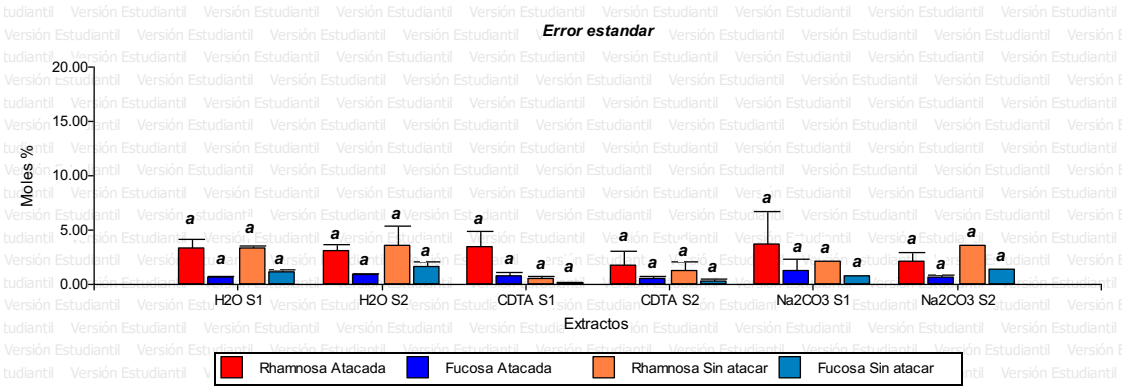
Figura 81 A y B: Porcentajes de monosacáridos neutros y ácidos urónicos en hojas en los diferentes extractos obtenidos durante la secuencia extractiva. A. Extractos obtenidos con: agua caliente, soluciones de CDTA y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). B. Soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final (RF). Barras T ubicadas por encima de cada barra vertical representan el EE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Respecto al contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros encontrados en los distintos extractos obtenidos, se observó que no existían diferencias significativas entre las plantas testigo y las plantas atacadas ( $p=0,6$ ) para las secuencias de  $\text{H}_2\text{O}$ , CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y tampoco en las de KOH 1M y 4M ( $p=0,7$  y  $p=0,7$ ), respectivamente. Sin embargo, en estos gráficos se ve claramente cómo varía la relación de ácidos urónicos a monosacáridos neutros en los diferentes extractos y el residuo final del proceso de extracción. Si bien la variabilidad entre las réplicas es importante, se observaron diferencias en las proporciones relativas. En particular, el primer extracto obtenido con soluciones de CDTA se observó un incremento en la proporción de monosacáridos ácidos respecto a los neutros, mientras que en ambas extracciones realizadas con soluciones de carbonato de sodio, se observó un efecto opuesto. En los primeros extractos de cada una de las concentraciones de KOH elegidas, KOH1MS1 y en KOH4MS1, respectivamente, se ven diferencias cualitativas importantes: En el primer caso, la relación de ácidos urónicos a monosacáridos neutros se invierte, mientras que en el segundo, los valores de ambos son bastante similares para las plantas testigo, pero se observó un aumento muy importante de los componentes ácidos en las plantas atacadas.

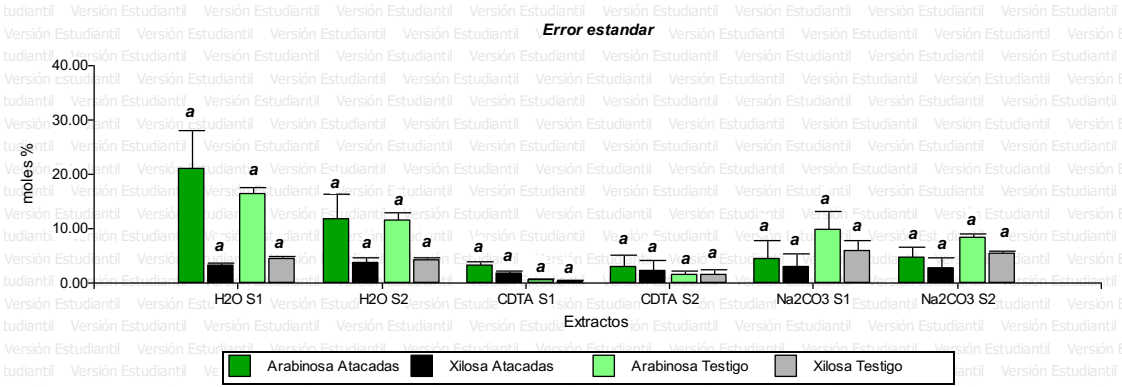
A.



B.



C.



D.

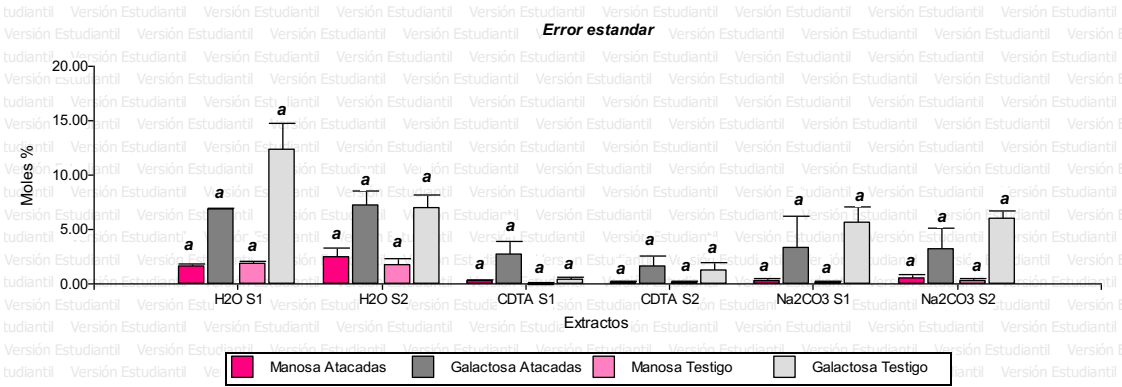
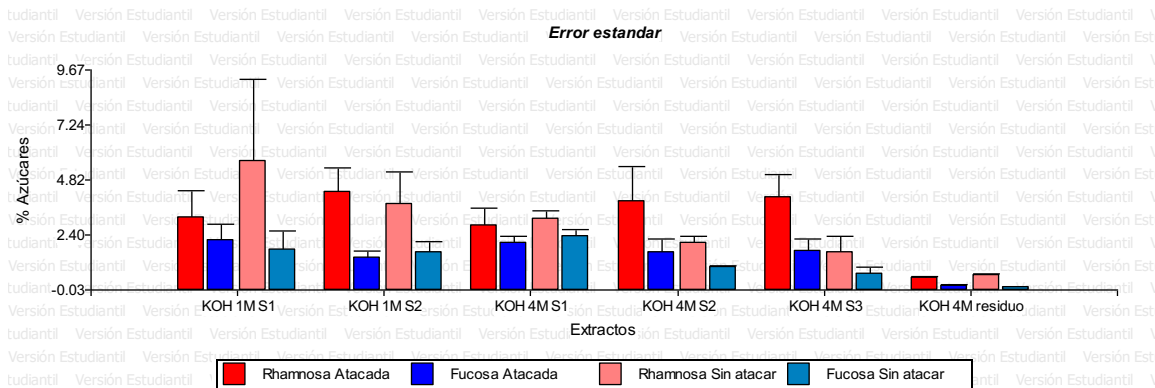
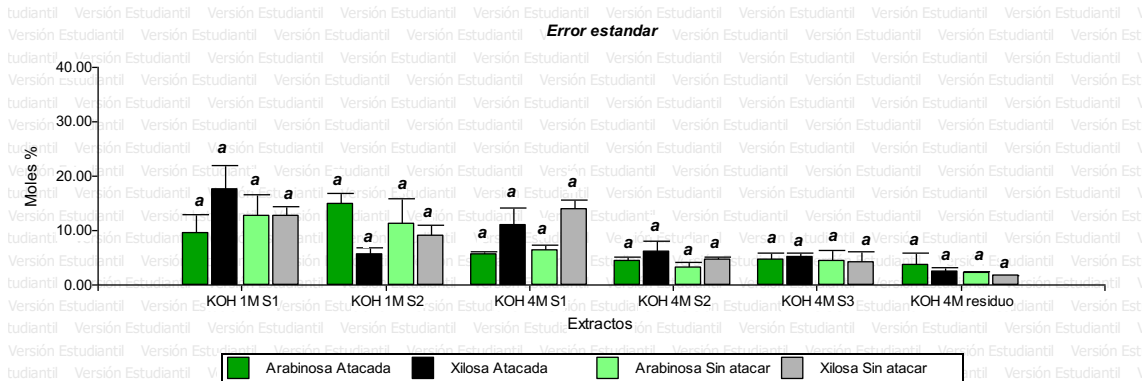


Figura 82 A B C D: Composición en monosacáridos en los extractos obtenidos de hojas de plantas de *L. tenuis* sometidas a estrés biótico por ataque de trips y hojas de plantas control. A-D Primeros extractos (extracción con agua caliente, soluciones acuosas de CDTA y carbonato de sodio).

E.



F.



G.

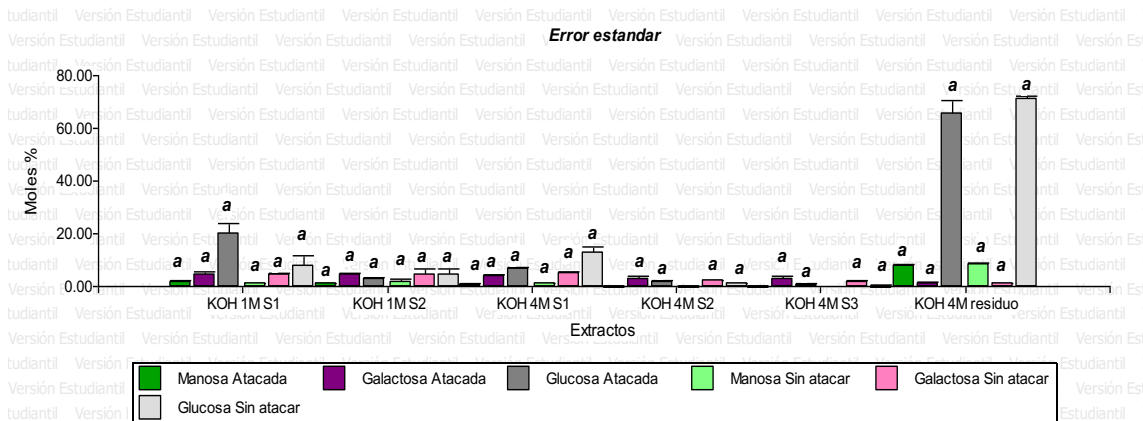


Figura 82: Composición en monosacáridos en los extractos obtenidos de hojas de plantas de *L. tenuis* sometidas a estrés biótico por ataque de trips y hojas de plantas control. A-D Primeros extractos (extracción con agua caliente, soluciones acuosas de CDTA y carbonato de sodio): A. El contenido de glucosa relacionado en forma directa con los  $\alpha$ -glucanos de reserva (almidón). B. Contenido de rhamnosa (Rha) y fucosa (Fuc). C. Contenido de arabinosa (Ara) y xilosa (Xyl). D. Contenido de manosa (Man) y galactosa (Gal). E-G Extractos obtenidos con soluciones fuertemente alcalinas (KOH 1M e KOH 4M) y residuo final del proceso extractivo: E. Contenido de rhamnosa (Rha) y fucosa (Fuc). F. Contenido de arabinosa (Ara) y xilosa (Xyl). D. Contenido de manosa (Man), galactosa Gal) y glucosa (Glc).

En las primeras secuencias de extracción correspondientes a los extractos obtenidos con agua caliente, soluciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  no se observaron diferencias

significativas en los moles % encontrados de: ramnosa ( $p=0,65$ ), fucosa ( $p=0,9$ ), arabinosa ( $p=0,98$ ), xilosa ( $p=0,2$ ), manosa ( $p=0,35$ ) y galactosa ( $p=0,2$ ) (Figura 82 A, B, C, D). Tampoco, se observaron diferencias significativas respecto a los moles % de los diferentes monosacáridos encontrados en las extracciones realizadas con KOH 1M y 4M de: ramnosa ( $p=0,8$ ), fucosa ( $p=0,7$ ), arabinosa ( $p=0,7$ ), xilosa ( $p=0,8$ ), manosa ( $p=0,1$ ), galactosa ( $p=0,6$ ) y glucosa ( $p=0,9$ ) (Figura 82 E, F, G).

#### 5.4.3.3 Análisis de los resultados obtenidos a partir de la secuencia extractiva de los polisacáridos.

Al analizar los residuos (gramos de materia seca (MS)) obtenidos de las extracciones de alcohol, acetona y éter (RIA) y los gramos de MS de los residuos y los extractos correspondientes a la secuencia extractiva con agua caliente, en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo, no se encontraron diferencias significativas en los residuos RIA de las extracciones realizadas con alcohol, acetona y éter etílico ( $p=0,04$ ), ni en los residuos y extractos obtenidos luego de las dos extracciones con agua caliente ( $p=0,7$ ) y ( $p=0,9$ ), (Figura 83).

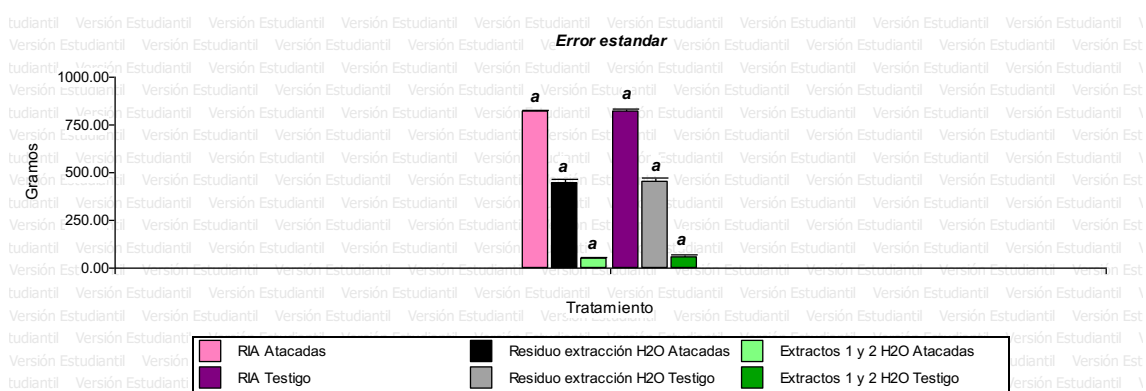


Figura 83 Gramos de materia seca obtenidos en los residuos correspondientes a las extracciones de alcohol-acetona-eter (RIA) y en los residuos y en los extractos correspondientes a la secuencia extractiva con agua caliente, en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Del mismo modo, al analizar los gramos de MS obtenidos luego de las extracciones con soluciones acuosas de CDTA sobre las plantas atacadas y las control, no se encontraron diferencias significativas, ni en los residuos ( $p=0,4$ ), ni en los extractos ( $p=0,2$ ). Lo mismo ocurrió al evaluar el comportamiento frente a la herbivoría, respecto a los gramos de MS de residuos y de los extractos obtenidos luego de dos extracciones con soluciones acuosas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $p=0,3$ ) y ( $p=0,7$ ), respectivamente (Figura 84).

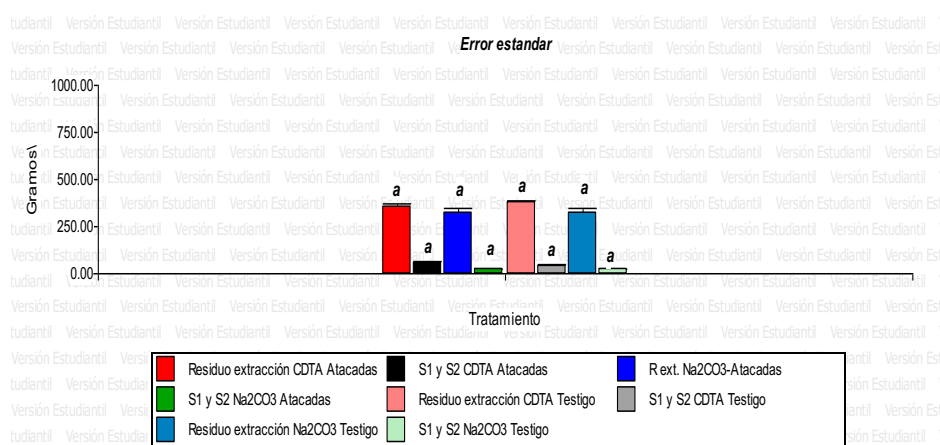


Figura 84: Gramos de materia seca obtenidos en los residuos y en los extractos correspondientes a las extracciones de CDTA y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Finalmente, siguiendo con la evaluación de las observaciones de la secuencia extractiva respecto a las hojas testigo y a las que fueron atacadas por trips, no se encontraron diferencias significativas en la materia seca recuperada en los residuos obtenidos luego de la extracción con KOH 1M ( $p=0,4$ ) y en el extracto S2 ( $p=0,3$ ), pero se encontraron diferencias significativas en el extracto S1 ( $p=0,07$ ) siendo la media de las plantas atacadas 26,7% menor que la de las plantas testigo. También, se observaron diferencias significativas respecto a la suma de los extractos KOH 1M S1 y S2 ( $p=0,06$ ), siendo la media para las plantas atacadas 24,7% menor que la de las plantas testigo (Figura 85).

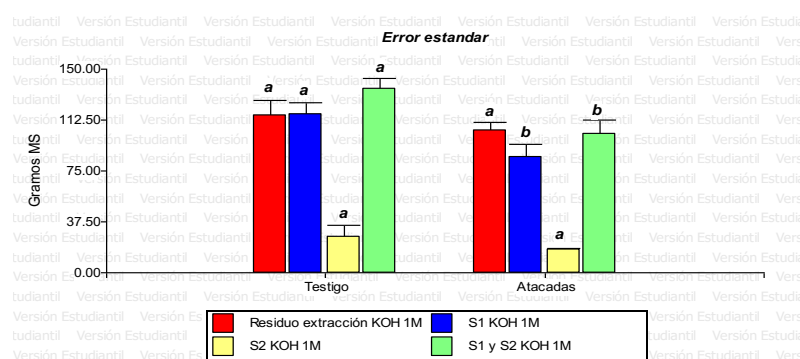


Figura 85: Gramos de materia seca obtenidos en los residuos y en los extractos correspondientes a las extracciones de KOH 1M y 4M, en relación a 1000 gramos iniciales de materia seca extraída de hojas de plantas atacadas y de las plantas testigo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,10$ ).

## 5.5 Discusión

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa frente a la herbivoría producida por insectos, que inducen respuestas en cascada para minimizar los daños, inhibir o repeler el ataque o emitir compuestos volátiles para atraer a depredadores. Los genes que codifican estas respuestas están ampliamente correlacionados con la forma de alimentación del herbívoro y con el grado de daño producido en el lugar del ataque (Walling 2000). Las primeras barreras de defensa del vegetal frente a este ataque están constituidas por la morfología de sus hojas (Scott-Brown et al. 2006), la cutícula y las paredes celulares. Algunos autores refieren cambios observados a nivel de las paredes celulares debidos a la herbivoría que generan un aumento en la deposición del polisacárido calosa ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucano) en las zonas afectadas (como un refuerzo físico) o, rodeando a las células atacadas. También, se refieren a un aumento de proteínas estructurales como las extensinas y de compuestos relacionados con la lignina (Hematy et al. 2009, Pieterse et al. 2009; Albersheim et al. 2011; Wolf et al. 2012).

El daño producido a las células vegetales activa respuestas reguladas por el ácido jasmónico, una fitohormona que induce defensas en las plantas como respuesta al ataque de insectos (ver Introducción 1.4). La síntesis de los jasmonatos se produce a partir de



ácido linolénico, que se desprende de la célula dañada. De esta forma, el ácido linolénico inicia la producción de ácido jasmónico a través de la denominada ruta de los octadecanoides. La ruta de biosíntesis de los jasmonatos es compleja, no sólo por el número y tipo de procesos involucrados, sino también porque ocurre en distintos lugares de la célula. El ácido jasmónico es sintetizado en el peroxisoma y de allí es transportado al citoplasma, donde activa el sistema de degradación de proteínas, que funciona como activador de los genes de defensa. Sin embargo, este compuesto debe unirse al aminoácido isoleucina para ser activado y así poder actuar. La disrupción de los tejidos vegetales por el ataque de insectos aumenta la producción del complejo ácido jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) (Zavala et al. 2006; Browse 2005). Estudios previos muestran la inducción de jasmonatos frente a la herbivoría por trips (Steenbergen 2018), también refieren la inducción del complejo Ja-Ile (Dillon et al 2018), en concordancia con los resultados observados en este experimento en el que las plantas atacadas mostraron un aumento en las concentraciones de JA y de JA-Ile medidas.

Respecto a la concentración de ácido 12-oxo-fitodienoico OPDA que constituye otro intermediario en la producción de JA (de Bruxelles et al 2015), en nuestro experimento no se observaron diferencias significativas entre las plantas atacadas y las testigo a diferencia de lo encontrado por Dillon et al (2018). De acuerdo a Scalschi et al. (2015), OPDA podría estar relacionado con la deposición de calosa en respuesta al ataque de *Botritis cinerea* en tomate.

Respecto al contenido de ABA, observamos que disminuyó en las plantas atacadas, lo cual era esperable, dado que los jasmonatos se encontraban inducidos y ABA atenúa la expresión génica dependiente de JA (Pieterse 2009). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de IAA entre las plantas testigo y las que fueron sometidas al estrés biótico, sin embargo su comportamiento es antagónico

con el de ABA y se encuentra en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular y (McSteen y Zhao 2008; Fahad et al. 2014).

Frente al estrés biótico producido por los trips, cabe esperar que existan células rotas, no reparables y vacías, que, en general, se encuentran bajo células epidérmicas colapsadas. Uno de los principales roles de las células que se encuentran intactas alrededor de las áreas afectadas es formar barreras físicas, fortaleciendo las paredes celulares o aislando las células afectadas para evitar la entrada de patógenos (de Bruxelles et al 2015).

Siendo *L. tenuis* una especie forrajera, mediante el análisis de su composición química por el sistema de detergentes de Van Soest (Van Soest 1994), no se observaron diferencias significativas entre las plantas afectadas por herbivoría de los trips y las plantas testigos respecto a % fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, hemicelulosas, celulosas y lignina. Algunos autores refieren que frente a la herbivoría, se observó engrosamiento de las paredes celulares alrededor de las áreas afectadas por entrecruzamiento de proteínas de las paredes celulares, síntesis de glicoproteínas de la pared (extensinas), producción de polímeros fenólicos (lignina), y síntesis de calosa para producir el cierre de las heridas y evitar la pérdida de agua (de Bruxelles et al. 2015).

De acuerdo a los resultados de los estudios de polisacáridos de paredes celulares de hojas de las plantas atacadas respecto de las testigo, apoyando los resultados encontrados en las determinaciones nutricionales, no se encontraron diferencias significativas respecto a los porcentajes de azúcares neutros, ni de ácidos urónicos y solamente encontramos diferencias significativas a nivel de polisacáridos de pared en las extracciones de hidróxido de potasio 1M. En este caso, las plantas atacadas presentaron 39,4% menos polisacáridos de pared con respecto a las plantas testigo, esta fracción correspondería a hemicelulosas no fuertemente retenidas a la pared. Tampoco, hubo diferencias en los

porcentajes de polisacáridos de reserva ( $\alpha$ -glucanos) que se obtuvieron en los primeros pasos de la secuencia extractiva.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la materia seca recuperada en los residuos y en los extractos obtenidos luego de las extracciones realizadas con H<sub>2</sub>O, CDTA, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y KOH 4M. Respecto a los residuos obtenidos de la extracción con KOH 1M, no se observaron diferencias significativas en la materia seca recuperada, pero se encontraron diferencias significativas en el extracto S1, siendo la media de las plantas atacadas 26,7% menor que la de las plantas testigo y también se observaron diferencias significativas respecto a la suma de los extractos KOH 1M S1 y S2, siendo la media para las plantas atacadas 24,7% menor que la de las plantas testigo.

## 5.6 Conclusiones

Debido a que *Lotus tenuis* es una especie forrajera, se consideraron distintas metodologías de análisis a utilizar, observando su complementariedad y las diferencias de las mismas para evaluar el efecto del estrés biótico producido por trips. Primero, se utilizó el sistema de detergentes de Van Soest, que es una de las metodologías clásicas de análisis de este tipo de alimentos, con el cual no se encontraron diferencias significativas respecto a este tipo de estrés en ninguno de los parámetros analizados entre las plantas atacadas y las testigo (FDN, FDA, Lig(FDA), CEL y HEMI). Después, para describir con mayor exactitud los cambios a nivel de la pared celular, se utilizaron otras mediciones químicas más específicas, que complementando las determinaciones anteriores, permitieron observar estructuralmente y cualitativamente donde se producían los efectos debidos al estrés biótico, evaluando la cantidad de azúcares totales, neutros, ácidos urónicos, polisacáridos de reserva y de pared en residuos y extracciones secuenciales realizados sobre la pared celular de las plantas atacadas y en las testigo. En base a estas determinaciones, se encontraron menores cantidades de polisacáridos de pared solamente

en los extractos obtenidos luego de las extracciones realizadas con KOH 1 M, que evidenciarían un menor contenido en hemicelulosas que no fue detectado con los parámetros nutricionales evaluados.

A su vez la inducción de los jasmonatos JA y Ja-Ile, muestra que existe una relación entre la regulación por estas hormonas y la herbivoría, siendo estas hormonas las que parecerían tener el efecto modulador en los cambios químicos en las paredes celulares de las células afectadas.

## 6. Capítulo 6 Consideraciones finales

### 6.1 En relación a las hipótesis planteadas

El objetivo general de este trabajo fue estudiar el efecto del estrés abiótico salino y biótico sobre la composición y morfología de las paredes celulares en las hojas y los tallos de *Lotus tenuis*. Las hipótesis planteadas puestas a prueba experimentalmente en los capítulos: 3, 4 y 5 a través de sus respectivas predicciones.

- H1) El estrés salino produce cambios en la composición química de la pared celular de tallos y hojas en estado vegetativo de *L. tenuis*, y este efecto es diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles al estrés salino.
- H2) La herbivoría de insectos induce cambios morfológicos y químicos en las paredes celulares de las células de las hojas atacadas.
- H3) Los cambios morfológicos y químicos de las paredes celulares de *L. tenuis* debido al estrés salino o herbivoría afectan la calidad nutricional de los tallos y las hojas de las plantas en estado vegetativo, afectando su digestibilidad potencial.

El estudio se centró primero en la observación y cuantificación de distintos parámetros de crecimiento y anatómico estructurales respecto al estrés salino y a la herbivoría por trips. Para evaluar el efecto del estrés salino se utilizaron dos familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* cedidas por el INTA Pergamino y que presentaban distinta susceptibilidad frente a este estrés (490 presenta mayor tolerancia a la salinidad y 2241 mayor susceptibilidad; Franco 2012). Para observar el efecto del estrés biótico se trabajó sin sal en el agua de riego y se utilizó el genotipo 490 (Ver Capítulo 3).

En segundo término, se observaron complementariedad y diferencias entre distintos análisis químicos que buscaban caracterizar las paredes celulares vegetales y los

cambios debidos al estrés salino (Capítulo 4) o al estrés biótico producido por trips (Capítulo 5).

Los parámetros analizados y presentados en el capítulo 3 respecto al porcentaje de materia seca de las hojas, los tallos y las raíces, la producción de biomasa aérea y radicular, el largo de los tallos y de las raíces y el número de las ramificaciones en los tallos por un lado. Y las observaciones por microscopía óptica de cortes transversales de las hojas, los tallos y las raíces por otro lado, fueron el punto de partida para evaluar los cambios producidos frente al estrés salino en los dos genotipos que presentaban distinta susceptibilidad a la salinidad. Se observó que el estrés salino afectó significativamente los parámetros de crecimiento conforme aumenta la dosis de sal en el agua de riego pero que este efecto no fue diferencial entre los genotipos estudiados. Al aumentar la dosis de sal en el agua de riego se redujo la biomasa y los gramos de materia seca producida, disminuyó la longitud de tallos y raíces y el número de las ramificaciones de los tallos, sin producir mortandad de plantas. Asimismo, mientras que el porcentaje de materia seca de los tallos y las hojas aumentó en las plantas que sufrieron estrés salino, el porcentaje de materia seca de las raíces no cambió.

Debido al estrés salino habría menor oferta forrajera. Como se mencionara en la introducción, cambios en la composición y morfología de las paredes celulares de esta forrajera podrían contribuir a explicar la tolerancia de la especie a dichos estreses. Para ello y previo a los análisis químicos, se evaluaron los cambios a nivel estructural mediante las observaciones por microscopía óptica sobre cortes transversales de hojas, tallos y raíces. Se observó que en las plantas de *Lotus tenuis*, el estrés salino produjo diferencias en los cortes de microscopía de las hojas, los tallos y las raíces, que mostraron un aumento en el grosor de las células epidérmicas, así como también, en el grosor de las paredes de los elementos de vaso y fibras. Sin embargo, el diámetro de los elementos de vaso en las

plantas que fueron sometidas al estrés salino fue menor que en las plantas testigo. Además, se redujo el diámetro de los tallos de las plantas que fueron regadas con sal y aumentó el tamaño de los cloroplastos en el parénquima cortical, y los estomas de la epidermis se observaban cerrados. En las hojas de las plantas que sufrieron el estrés salino, los estomas se encontraban cerrados, aumentó el espesor de las hojas y también el tamaño de los cloroplastos en las células del mesófilo. En las raíces de las plantas que fueron regadas con agua con sal, se observó abundante presencia de almidón en el tejido parenquimático. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los genotipos estudiados.

Respecto a las observaciones realizadas sobre las plantas que sufrieron el estrés biótico producido por trips, en el experimento 3 (capítulos 3 y 5) no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento (producción de biomasa y materia seca de las hojas y los tallos), pero sí se observaron cambios a nivel anatómico estructural en las hojas.

Como se había planteado en las hipótesis H1) y H3), modificaciones en las paredes celulares de *L. tenuis* y en la estructura de los polisacáridos que las forman, constituyen mecanismos importantes en la adaptación de estas plantas a los ambientes de alto grado de salinidad. Estas modificaciones no sólo implican un cambio en el grosor de las paredes celulares y en el tamaño de las células, sino que además podrían tener consecuencias en la composición en los polisacáridos de la pared y su estructura fina. Para evaluar el efecto de las condiciones de estrés biótico o abiótico que podrían afectar las paredes celulares, se realizaron determinaciones químicas.

Como esta es una especie forrajera, primeramente se utilizaron las determinaciones de fibra detergente neutro y ácido y lignina que son las habitualmente utilizadas para caracterizarlas nutricionalmente. Se observó que la FDN y FDA de los

tallos disminuyeron a medida que aumentó la concentración salina en el agua de riego, sin encontrarse diferencias entre los genotipos. En las hojas el estrés salino redujo la FDN sólo en la dosis de concentración salina media y la FDA se redujo a medida que aumentó el estrés sufrido. Respecto al contenido de lignina no se encontraron diferencias significativas debidas a las condiciones de estrés salino.

Estos cambios encontrados afectarían la digestibilidad, aspecto que fue evaluado mediante la técnica de producción de gas. Mediante esta técnica se encontraron diferencias entre tallos y hojas, y también un aumento en la producción de gas entre las 0 y 10 hs para los tallos regados con la mayor concentración salina en el agua de riego. Respecto a la digestibilidad *in vitro* de los tallos a las 48 hs, se observó un aumento en la digestibilidad a medida que aumentaba el estrés salino, en cambio no se apreció una diferencia significativa debido al estrés en las hojas. Los resultados encontrados hasta este punto permitieron estimar cambios en los polisacaridos de las paredes celulares vegetales debidos al estrés salino, pero no permitieron identificar cual o cuales serían los afectados. Para ello, se realizaron extracciones y determinaciones químicas más específicas sobre los tallos y las hojas de las plantas sometidas al estrés salino (capítulo 4) y sus correspondientes controles.

En los residuos y los extractos obtenidos luego de realizar las extracciones con etanol, acetona y éter (AIR), y luego de las dos extracciones con agua caliente se determinó que no había diferencias significativas en el porcentaje de polisacáridos extraídos entre los genotipos tolerante y susceptible. Por otra parte, sí se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración salina del agua de riego, disminuyendo el porcentaje de residuo recuperado a medida que aumentaba el estrés salino, y mostrando solo un aumento significativo en los extractos en la dosis 150 mM NaCl respecto al control. No se observaron diferencias en la composición en



monosacáridos obtenidos entre los genotipos tolerantes y susceptibles, tanto para los testigos como para las plantas que fueron regadas con la dosis 150 mM NaCl. Los resultados referidos hasta este punto apoyan las hipótesis planteadas al observar cambios en los parámetros evaluados pero se rechazó la parte concerniente a los genotipos utilizados, ya que no se observaron diferencias significativas entre ellos, por lo cual se decidió seguir trabajando con el genotipo considerado "tolerante", que producía mayor biomasa.

Con la extracción química más detallada se observó en los extractos acuosos de los tallos un mayor contenido de glucanos de reserva y menor contenido de pared que en los extractos de la plantas regadas con soluciones salinas conforme aumenta el estrés. Respecto a la composición en monosacáridos, se obtuvo en todos los casos un alto contenido de ácido galacturónico proveniente de pectinas solubles. La presencia de ramnosa y cantidades importante de arabinosa y galactosa indicaron un elevado contenido de ramnogalacturonano I (RGI), además de homogalacturonano (HG) y pequeñas cantidades de posibles xilogalacturonanos y otros polímeros pécticos. Del mismo modo en los extractos de CDTA correspondientes a las pectinas (menos fuertemente unidas) el porcentaje de polisacáridos de pared fue mucho menor en los extractos obtenidos de plantas que crecieron en condiciones de salinidad, indicando que la proporción de homogalacturonanos libres es menor. En los extractos obtenidos con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , respecto a los ácidos urónicos determinados, 18,8 % correspondían a ácido glucurónico y 66,1 % a ácido galacturónico, esto indicaría la presencia de un porcentaje apreciable de polisacáridos diferentes de las pectinas (hemicelulosas solubles en soluciones alcalinas suaves). En los extractos con KOH 1M se encontró, junto con las hemicelulosas, aún cantidades importantes de pectinas y se observó que las hemicelulosas aumentaban con el aumento de la concentración salina en el agua de riego. De los extractos obtenidos con

KOH 4M a partir de los tallos se dedujo que hubo una disminución en la proporción relativa de glucuronoxilanos en los dos primeros extractos y aun se observó una mezcla de pectinas con importante proporción de arabinanos, cuyo contenido tendía a aumentar en todos los pasos con el aumento de NaCl en el agua de riego.

En los extractos acuosos obtenidos de las hojas frente al estrés salino se obtuvieron pectinas solubles en agua con muy bajos rendimientos en cuanto al total de polisacáridos. Solamente en el primer extracto acuoso disminuyó el contenido de ácidos urónicos al ser sometidas al estrés. Al realizar las extracciones con CDTA, se encontraron cantidades despreciables de polisacáridos de reserva y se observó un importante aumento del porcentaje de ácidos urónicos en el primer extracto en condiciones de alta salinidad (CDTA 1, HD2T). En cambio las pectinas extraídas de hojas con soluciones diluidas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  mostraron menor proporción de ácidos urónicos y una mayor proporción de cadenas laterales de arabinogalactanos, con predominio de arabinosa. En el primer extracto no se observaron diferencias importantes en función del contenido de NaCl en el agua de riego. En cambio, en el segundo se observó una disminución en el contenido de arabinosa y galactosa, que corresponden a los arabinogalactanos y un aumento en el contenido de ácidos urónicos. Los extractos obtenidos con KOH 1M presentaron una mínima cantidad de xilosa a diferencia de los tallos donde la proporción fue alta.

La masa de polisacáridos que se solubilizaron en la secuencia extractiva a medida que aumentaba el estrés salino fue baja para las hojas a diferencia de los tallos en los cuales el aumento se produjo, tanto para polisacáridos de pared celular, como para los polisacáridos de reserva.

Respecto a la herbivoría se realizaron las determinaciones químicas sobre las hojas de las plantas sometidas al estrés biótico por trips y sobre los controles (capítulo 5). Al analizar los resultados de las determinaciones químicas nutricionales entre las hojas

de las plantas atacadas y las hojas de las plantas control no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados: FDN, FDA y Lig/FDA. En cambio, respecto al porcentaje de polisacáridos de pared obtenidos durante la secuencia extractiva de las determinaciones químicas más específicas, si bien no se encontraron diferencias significativas para las secuencias de H<sub>2</sub>O, CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y tampoco en las de KOH 1M S1 y 4M, se encontraron diferencias significativas en el extracto KOH 1M S2, donde las plantas atacadas por trips presentaron menor cantidad de polisacáridos en sus paredes celulares respecto a las testigo. Respecto a los polisacáridos de reserva, no se observaron diferencias significativas para las secuencias de extracción con agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Respecto al contenido de ácidos urónicos y azúcares neutros encontrados en los distintos extractos obtenidos, se observó que no existían diferencias significativas entre las plantas testigo y las plantas atacadas para las secuencias de H<sub>2</sub>O, CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y tampoco en las de KOH 1M y 4M y tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a los moles % de los diferentes monosacáridos encontrados en las extracciones realizadas.

Paralelamente se cuantificaron las hormonas ácido salicílico (SA), jasmonatos (ácido jasmónico (JA), jasmónico-isoleucina (Ja-Ile) y ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido abscísico (ABA) y ácido indolacético (IAA) para observar la modulación de la respuesta vegetal frente al estrés salino y frente al estrés biótico. Respecto al estrés salino, solamente se observaron diferencias significativas referidas a una marcada reducción en la concentración encontrada de JA-Ile en las plantas que recibieron el estrés salino más severo. Por otra parte respecto a la respuesta encontrada debido al estrés biótico se observó un aumento muy significativo en las concentraciones de JA y JA-Ile,

una disminución en la concentración de ABA y no se encontraron diferencias en SA, OPDA e IAA frente a la herbivoría.

## **6.2 Discusión de los resultados de la tesis.**

Las plantas de *Lotus tenuis* frente al estrés salino pueden responder por medio de diversos mecanismos para atenuar el efecto de los altos niveles de sal en el agua de riego, viéndose afectados sus parámetros de crecimiento, en concordancia a lo encontrado por otros autores como Munns y Gilliam 2015, Pesqueira 2008, Escaray 2007, Teakle et al. 2010, Dolbatadian et al. 2011 y Paz et al. 2014. Esta es una especie forrajera consumida por animales rumiantes en pastoreo como fuente de energía y proteínas para producción de carne. Como se mencionó en la discusión parcial del Capítulo 3.5.1 la disminución del crecimiento de *L. tenuis* debida al estrés impactaría negativamente a nivel productivo, ya que las plantas presentan una menor oferta forrajera de biomasa de tallos y de hojas para el pastoreo, menor longitud de tallos y menor número de ramificaciones. Esta reducción en la biomasa producida, con una menor longitud de los tallos y un menor número de ramificaciones aportará menor cantidad de raciones por hectárea y hará que el rumiante esté más tiempo buscando el alimento hasta saciar su consumo voluntario, disminuyendo la eficiencia energética de su alimentación (Bondi, A. 1989, Mc Donald et al. 2006). También, en este estudio el alto contenido salino del agua de riego disminuyó la biomasa radicular y el largo de las raíces, que redundarían en una menor capacidad de la planta para explorar el perfil del suelo y posiblemente menor capacidad para rebrotar.

En los cortes transversales de hojas y de tallos observados por microscopía óptica se encontró un mayor grosor de las células epidérmicas en las plantas que fueron sometidas al estrés salino respecto de las plantas testigo, así como también, un aumento en el grosor de los elementos de vaso y fibras, y un menor diámetro interno. Dolatabadian

et al 2011, encontraron que las plantas de soja afectadas por el estrés salino presentaban un aumento del grosor de las células epidérmicas, cambios a nivel del xilema, pero a diferencia de los resultados presentados en este trabajo, ellos encontraron un aumento en el contenido de lignina en los tallos.

En este trabajo, las observaciones de los cortes transversales de las plantas que sufrieron el estrés salino permitieron visualizar cambios estructurales, que podrían tener un impacto negativo sobre el aprovechamiento de los tallos y las hojas en la alimentación de animales rumiantes. El engrosamiento de las paredes celulares sugiere un menor consumo voluntario debido a un llenado ruminal más rápido y una menor digestibilidad del material consumido (Mc Donald 2006). Para evaluar el efecto del estrés salino sobre los componentes de las paredes celulares que pueden afectar la nutrición de animales rumiantes, se realizaron las determinaciones de FDN y FDA. En los tallos, la concentración de FDN y FDA disminuyó a medida que aumentó el estrés salino, resultados similares fueron encontrados en tallos y hojas de *L. corniculatus* (Boga et al. 2014), sugiriendo una mayor digestibilidad y un mayor consumo voluntario de las plantas afectadas por el estrés salino, a diferencia de lo que se suponía de acuerdo a los parámetros de crecimiento y a los cortes de microscopía. Mediante la técnica de producción de gas, se encontraron diferencias entre tallos y hojas. En particular, se encontró un aumento en la producción de gas entre las 0 y las 10 hs para los tallos regados con niveles más altos de sal en el agua de riego, a diferencia de lo presentado por Boga et al (2014) para *Lotus corniculatus*, *Trifolium alexandrinum* y *Medicago sativa*. Estos autores no encontraron diferencias significativas debidas al estrés salino, pero los análisis se efectuaron sobre una mezcla de tallos y hojas. En este estudio se observó que la digestibilidad *in vitro* aumentó en los tallos, con mayores niveles de estrés salino. Resultados similares fueron encontrados por los mismos autores para *L. corniculatus*, pero no así para *M. sativa*. Este

resultado podría estar asociado a que *L. tenuis*, en mayor medida, y *L. corniculatus*, en menor medida, son más resistentes al estrés salino en comparación con *M. sativa*.

De acuerdo a los resultados expuestos hasta este punto, frente al estrés salino las plantas presentarían menor biomasa al pastoreo, pero su digestibilidad sería mayor y el consumo final podría ser mayor, especialmente para los tallos debido al menor tiempo de retención ruminal.

Cuando se relacionaron los resultados encontrados con los obtenidos a partir de la secuencia extractiva, hay que tener en cuenta que un aumento en la proporción de paredes secundarias en los tejidos como consecuencia del estrés salino, esta diferencia debería detectarse principalmente en el porcentaje del residuo final, constituido principalmente por celulosa y polisacáridos ácidos muy insolubles y, eventualmente, sobre todo en el caso de los tallos en los extractos alcalinos, en los que se detectaron cantidades importantes de hemicelulosas (glucuronoxilanos) provenientes de paredes secundarias. Sin embargo, respecto al residuo final del proceso extractivo, no se vio una modificación en el rendimiento en hojas a diferencia de lo encontrado por Barbosa de Lima (2014), estudiando hojas de café en las que se observó un aumento en el contenido de residuo final, asociado a un incremento en el contenido de lignina. En nuestro trabajo no tuvimos diferencias significativas respecto al contenido de lignina en hojas y en tallos debida al estrés salino. Con respecto a los tallos de *L. tenuis*, se observó un claro descenso en el rendimiento, principalmente en las plantas regadas con la Dosis 2 de 150 mM de NaCl.

Se observó también un aumento en el contenido de pectinas presentes en los extractos acuosos y los obtenidos con soluciones de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a medida que aumentaba el estrés salino, más marcado en tallos que en hojas. Las pectinas, son un grupo de

polisacáridos con alta proporción de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico de estructuras sumamente complejas, como se explicó en el Cap 1 que, entre otras funciones, intervienen en el control de la porosidad de la pared celular y en la adhesión entre células (Willats et al 2001).

Respecto a los extractos obtenidos en medio fuertemente alcalino a partir de tallos, se observaron diferencias muy importantes en el contenido de monosacáridos (Xyl, Glc, ácidos urónicos) provenientes de hemicelulosas, principalmente en los extractos obtenidos con KOH 1M. Por ejemplo, en el primer extracto, estos valores fueron, en forma aproximada, 33:4:57, para el testigo, 46:14:34, para la Dosis 1 de 75 mM de NaCl y 46:16:31, para la Dosis 2. Además, el rendimiento fue de aproximadamente 7% para el testigo, mientras que para ambas concentraciones de sal aplicada al agua de riego, fue el doble.

Otras diferencias importantes se detectaron en los siguientes extractos, obtenidos con soluciones de KOH 4M, indicando grandes diferencias en la solubilidad de los diferentes componentes a ser extraídos por estos solventes, además de las diferencias en sus porcentajes relativos. Estos resultados en conjunto sugieren que, si bien las paredes celulares se engrosaron por acción del estrés salino, esto se debería a una diferencia en el entramado molecular, que sería más laxo y extendido, permitiendo un mayor grado de extracción en las condiciones utilizadas.

Frente al estrés salino, las mediciones realizadas por la extracción secuencial más específica y compleja sobre la pared celular de tallos y de hojas permitieron complementar los resultados obtenidos por las metodologías mas clásicas utilizadas para la valoración nutricional de los forrajes, haciendo posible también inferir más datos sobre

la estructura y la interrelación de los polisacáridos que forman parte de las paredes celulares, aunque sean técnicas más complejas y laboriosas.

Con respecto a lo observado en las hojas de *L. tenuis* frente a la herbivoría producida por trips, se observaron cambios a nivel anatómico-estructural que mostraron que el ataque existió y tuvo consecuencias apreciables a nivel de las hojas similares a los resultados encontrados por Chisholm y Lewis 2009 en hojas de plantas de trigo. También, la inducción de los jasmonatos JAy JA-Ile prueba que se generó una respuesta en las hojas de la planta frente a este estrés, de acuerdo a lo publicado por Steenbergen et al. 2018 y Walling 2008. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento evaluados, aunque sí se observaron diferencias en las determinaciones de caracterización de las paredes celulares, que evidenciaron un menor contenido de hemicelulosas, no detectado a partir de los las determinaciones de FDN y FDA. Esto sugeriría que las plantas de algún modo habrían compensado las consecuencias del ataque con la intensidad provista en este experimento. Queda para un futuro repetir la experiencia con un ataque de mayor intensidad, para determinar cuál sería el límite de dicho mecanismo de compensación o si la alteración observada fue de muy baja magnitud y se necesitaría un estrés más severo para lograr observar cambios más representativos.

### **6.3 Perspectivas derivadas**

En función del objetivo general, evaluar los cambios a nivel de las paredes celulares debidos al estrés salino y biótico, se observó que el sistema de detergentes de Van Soest permitió mostrar una disminución en el contenido de FDN y FDA conforme aumentaba el estrés salino en tallos, mientras que el análisis secuencial permitió inferir a



qué fracciones de la pared celular correspondían esas modificaciones. Por otra parte, aunque el método de detergentes utilizado en el estrés biótico producido por herbivoría de trips no dio diferencias significativas entre los tratamientos, el sistema de extracción secuencial demostró diferencias a nivel de las hemicelulosas de las paredes celulares, mostrando una mayor sensibilidad. Estos resultados llevan a pensar distintas líneas de trabajo para un futuro:

1. Profundizar en las mediciones nutricionales con metodologías “*in vivo*” por ejemplo “*degradabilidad in situ*” para evaluar el efecto del estrés salino en el aprovechamiento de ese forraje por un rumiante.
2. Profundizar en el análisis del efecto de la herbivoría producida por trips realizando un nuevo experimento con un ataque de mayor severidad, para ver si se mantienen los resultados y las tendencias encontradas.
3. Ahondar en el estudio de la estructura de los polisacáridos de aquellas fracciones obtenidas por extracción secuencial de las paredes celulares en las que se observaron las mayores diferencias, para conocer con mayor exactitud la naturaleza de las mismas.

## 7. Bibliografía

- Ahmed E.L.R., Labavitch J.M. (1978) A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry* 1:361–365. [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.1978.tb00193.x>
- Albersheim, A., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin A. (2011) Plant Cell Walls, from Chemistry to Biology. In: Garland Sc. New York
- An, C. and Mou, Z. (2011), Salicylic Acid and its Function in Plant ImmunityF. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53: 412-428. doi:[10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x)
- Andrés A., and Rosso B. (2007) Characterization of Lotus glaber germplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter* 37:24.
- Antonelli, C.J. 2010. Estrés por inundación en leguminosas del género Lotus: estudios morfológicos, anatómicos, fisiológicos, moleculares y de su relación simbiótica con rizobios. Tesis Doctoral Repositorio FAUBA
- Aquino R.S., Grativol C., Mourão P. a S. (2011) Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants. *PloS one* 6:e18862. [online] URL:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 14 February 2013).
- Araújo, S.S., S. Beebe, M. Crespi, B. Delbreil, E.M. González, et al. 2015. Abiotic Stress Responses in Legumes: Strategies Used to Cope with Environmental Challenges. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* doi: 10.1080/07352689.2014.898450.
- Arsuffi, G, Braybrook, S.A.(2018); Acid growth: an ongoing trip, *Journal of Experimental Botany*, Volume 69, Issue 2, 4 January 2018, Pages 137–146, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx390>
- Aspinall G.O. (1982) The Polysaccharides. Academic Press, New York, Estados Unidos.
- Ausubel F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol* 6:973–979.
- Balbi V., Devoto A. (2008) Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *The New phytologist* 177:301–18. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042205> (accessed 28 February 2013).
- Bar-Peled M, O'NeillMA. 2011. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu Rev Plant Biol.* 62:127–155
- Barret-Lennard E.G. (2003) The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil* 253:35–54.

- Batista, WB; Taboada, MA; Lavado, RS; Perelman, SB, y R.J.C. León, 2005. Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. En: Oosterheld, M.; Aguiar, M.R.; Ghera, C.M.; Paruelo, J.M., editores. La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando León. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires: 113-129
- Ben-Ghedalia, D., R. Solomon, J. Miron, E. Yosef, Z. Zomberg, et al. 2001. Effect of water salinity on the composition and in vitro digestibility of winter-annual ryegrass grown in the Arava desert. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91(3-4): 139-147. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00218-8.
- Benzarti, M., K. Ben Rejeb, D. Messedi, A. Ben Mna, K. Hessini, et al. 2014. Effect of high salinity on *Atriplex portulacoides*: Growth, leaf water relations and solute accumulation in relation with osmotic adjustment. *South African J. Bot.* doi: 10.1016/j.sajb.2014.08.009.
- Boateng, C.O., Schwartz, H.F., Havey, M.J. Otto, K. (2014) Evaluation of Onion Germplasm for Resistance to Iris Yellow Spot (Iris yellow spot virus) and Onion Thrips, Thrips tabaci *Southwestern Entomologist* 39 (2), 237-260
- Bohnert, H.J., Jensen R.G. (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* 23:661-667.
- Bondi, A.A.(1989) *Nutrición Animal* Editorial Acribia 562 pp. ISBN: 8420006629 9788420006628
- Boga, M., S. Yurtseven, U. Kilic, S. Aydemir, and T. Polat. 2014. Determination of Nutrient Contents and In vitro Gas Production Values of Some Legume Forages Grown in the Harran Plain Saline Soils. 27(6): 825-831.
- Botha C.E.J., Matsiliza B. (2004) Reduction in transport in wheat ( *Triticum aestivum* ) is caused by sustained phloem feeding by the Russian wheat aphid. *South African Journal of Botany* 70:249-254. [online] URL: <http://eprints.ru.ac.za/290/1/botha2004t.pdf>
- Bowne J B.A. (2011) Abiotic stress and metabolomics. *Annu Plant Rev* 43:61-85.
- Braidwood, L., C. Breuer, and K. Sugimoto. 2014. My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.12473
- Brett, C. and Waldron K. (1990) *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman
- Browse J. (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual review of plant biology* 60:183-205. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19025383> (accessed 28 February 2013).
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R. (2000) *Biochemistry and molecular biology of plants* (A.S. of plant Biology, Ed.).

- Burkart, S. E., León, R.J. y Movia, C.P. 1990. Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Prov.Bs.As.) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* 30: 27-69.
- Burkart, S.E., Garbulsky, M.F., Ghera, C.M., Guerschman, J.P., León, J.C.R., Oesterheld, M., Paruelo, J.M. y Pérelman, S.B.2005. Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. En: *La Heterogeneidad de la Vegetación de los Agroecosistemas. Un Homenaje a Rolando León*. Eds: M.Oesterheld, M. Aguiar, C. Ghera y J. Paruelo. Editorial de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Buxton, D.R. , Casler M.D. (1993) Forage cell wall Structure and digestibility. In: ASA-CSSA-SSS (ed) 677 Madison, WI 53711, USA, pp 685–714.
- Byrt, C.S., R. Munns, R.A. Burton, M. Gilliam, and S. Wege. 2018. Root cell wall solutions for crop plants in saline soils. *Plant Sci.* 269(January): 47–55. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.12.012.
- Cabot, C., J. V. Sibole, J. Barceló, and C. Poschenrieder. 2014. Lessons from crop plants struggling with salinity. *Plant Sci.* doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.013.
- Cachorro, P., A. Ortiz, and A. Cerdá. 1993. Growth, water relations and solute composition of *Phaseolus vulgaris* L. under saline conditions. *Plant Sci.* 95(1): 23–29. doi: 10.1016/0168-9452(93)90075-B.
- Cambareri, G.S., J. Castaño, O.N. Fernández, N.. Maceira, and O.R. Vignolio. 2012. *Lotus tenuis*: un recurso forrajero estratégico para la ganadería de la Pampa Deprimida.
- Carpita N.C., Gibeau D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 3:1–30. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401598>
- Carrillo, Jorge *Manejo de pasturas*. Balcarce: INTA, 2003. 457 p. ISBN 9789875210899.
- Chaplin, M.F. & Kennedy J.. (1994) *Carbohydrate Análisis. A practical Approach*.Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.
- Chen, T.H.H., Murata N. (2000) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5:250–257.
- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J.-K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45:437–448. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-14844342962&partnerID=40&md5=dc7db018314581a26fa97384ee7ce836>

- Chisholm, I.F., and T. Lewis. 1984. A new look at thrips (Thysanoptera) mouthparts, their action and effects of feeding on plant tissue. *Bull. Entomol. Res.* doi: 10.1017/S0007485300014048.
- Choi D., Lee Y., Cho H., Kende H. (2003) Regulation of Expansin Gene Expression Affects Growth and Development in Transgenic Rice Plants. 15:1386–1398.
- Ciancia M., Alberghina J., Arata P.X., Benavides H., Leliaert F., Verbruggen H., Estevez J.M. (2012) Characterization of cell wall polysaccharides of the coencocytic green seaweed *bryopsis plumosa* (bryopsidaceae, chlorophyta) from the argentine coast. *Journal of Phycology* 48:326–335. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84859429050&partnerID=40&md5=4d4e8867775e47b23077938b54d50be1>
- Ciancia M, Quintana I, Vizcargüénaga MI, Kasulin L, de Dios A, Estevez JM C.A. (2007) Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis,. *Int J Biol Macromol* 41:641–649.
- Ciucanu I., Kerek F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131:209–217. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34447326804&partnerID=40&md5=5ab270115fbcd8568cabfbf36e5ea786>
- Cosgrove D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861. [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Res.* 2016;5:119. [PMC free article] [PubMed]
- Cranshaw W. S. 2004. Onion thrips in onions XXV. Agricultural Experiment Station, Colorado State University, Fort Collins, CO. (<http://wiki.bugwood.org/uploads/OnionThrips-Onions.pdf>) (last accessed April 2015)
- Cranshaw, W. S. 2006. Colorado Insecticide Trials for Control of Thrips on Onions, 1995–2006. Colorado State Univ. Agric. Exp. Stn. Rep. TB06-01.
- Criado, C.A 2014 Lotus “Pampa” INTA Una herramienta de trabajo para los suelos bajos inundables. Publicación Técnica Marzo EEA Cuenca del Salado 13pp.
- Christensen, J. H., G. Bauw, K. G. Welinder, M. Van Montagu, and W. Boerjan, 1998: Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* 118, 125–135.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. 2010. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651–679.
- Dangl J.L., Jones J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833. [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35081161>

- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H. (2013) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.006
- Debez, A., K. Ben Hamed, C. Grignon, and C. Abdelly. 2004. Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Soil* 262(1): 179–189. doi: 10.1023/B:PLSO.0000037034.47247.67.
- Diaz-Montano, J., Fuchs, M., Nault, B., Fail, J., Shelton, A.; Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae): A Global Pest of Increasing Concern in Onion, *Journal of Economic Entomology*, Volume 104, Issue 1, 1 February 2011, Pages 1–13, <https://doi.org/10.1603/EC10269>
- Dicke, M., and I.T. Baldwin. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help.’ *Trends Plant Sci.* 15(3): 167–175. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2009.12.002.
- Dita, M. A., Risipail, N., Prats, E., Rubiales, D., and Singh, K. B. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1–24
- Dillon, F.M., M.D. Tejedor, N. Ilina, H.D. Chludil, A. Mithöfer, et al. 2018. Solar UV-B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatilis* larvae in field-grown soybean. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.13104.
- Doane P.H., Schofield P., Pell A.N. (2014) Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Neu. :3342–3352.
- Dolatabadian, A., S. Ali, M.M. Sanavy, and F. Ghanati. 2011. Effect of Salinity on Growth, Xylem Structure and Anatomical Characteristics of Soybean. *Not Sci Biol* 3(1): 41–45. [www.notulaebiologicae.ro](http://www.notulaebiologicae.ro).
- Dreyer D.L., Campbell B.C. (1987) Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant, Cell & Environment* 10:353–361. [online] URL: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-3040.ep11603601>
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350–356. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33749946901&partnerID=40&md5=08af49741f92b5eeae0cb5fa0f591800>
- Duran-Flores D, Heil M. 2016. Sources of specificity in plant damaged- self recognition. *Current Opinion in Plant Biology* 32, 77–87.
- Ellis C., Karafyllidis I., Wasternack C., Turner J.G. (2002) The Arabidopsis Mutant cev1 Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses. 14:1557–1566.

- Escaray F.J. (2007) Taninos condensados en leguminosas del género *Lotus* : Estudio de sus funciones biológicas y evaluación de su utilidad en el mejoramiento de la calidad forrajera de especies de importancia agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires
- Escaray F.J., Menendez A.B., Gárriz A., Pieckenstain F.L., Estrella M.J., Castagno L.N., Carrasco P., Sanjuán J., Ruiz O. a (2012) Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 182:121–33. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118623> (accessed 14 February 2013).
- Estevez J.M., Ciancia M., Cerezo a S. (2001) DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *gymnogongrus torulosus*. *Carbohydrate research* 331:27–41. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284503>
- Estevez JM, Fernández PV, Kasulin L, Dupree P C.M. (2009) Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*,. *Glycobiol* 19:212–228.
- Fangel, J. U., Ulvskov, P., Knox, J. P., Mikkelsen, M. D., Harholt, J., Popper, Z. A., et al. (2012). Cell wall evolution and diversity. *Front. Plant Sci.* 3:152. doi: 10.3389/fpls.2012.00152
- Fernández P. V., Ciancia M., Miravalles A.B., Estevez J.M. (2010) Cell-Wall Polymer Mapping in the Coenocytic Macroalga *Codium Vermilara* (Bryopsidales, Chlorophyta)1. *Journal of Phycology* 46:456–465. [online] URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.2010.00821.x> (accessed 10 April 2013).
- Filisetti-Cozzi T.M.C.C., Carpita N.C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197:157–162. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025848138&partnerID=40&md5=66563776696464ad64112a0a5faac0fe>
- Foster, K.J., and S.J. Miklavcic. 2015. Toward a biophysical understanding of the salt stress response of individual plant cells. *J. Theor. Biol.* doi: 10.1016/j.jtbi.2015.08.024.
- Fougère, F., D. Le Rudulier, and J.G. Streeter. 1991. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 96(4): 1228–36. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1080920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Franco M.E. (2012) Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* sometido a estress salino. INTA Pergamino UNRosario
- Fry S.C. (1988) The growing plant cell wall: chemical and metabolic analisis. In: Longman Scientific & Technical H (ed) Harlow, Essex, England, pp 102–187.

- Fukuyama Y., Ciancia M., Nonami H., Cerezo A.S., Erra-Balsells R., Matulewicz M.C. (2002) Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated neocarrabiose oligosaccharides. *Carbohydrate research* 337:1553–62. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12350325>
- Gao, Z., M. Sagi, and S.. Lips. 1998. Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci.* 135(2): 149–159. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00085-5.
- Geilfus, C.-M. 2017. The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. *Mol. Plant* 10(11): 1371–1386. doi: 10.1016/J.MOLP.2017.09.018.
- Gill, H., Garg, H., Gill, a.k., Gillett-Kaufman, J.L., Nault, B.A.; Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae) Biology, Ecology, and Management in Onion Production Systems, *Journal of Integrated Pest Management*, Volume 6, Issue 1, 1 March 2015, 6, <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv006>
- Gimeno, V., Syvertsen, J.P., Simón, I., Nieves, M., Díaz, López, L., Martínez, V., García-Sánchez F. (2012) Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. *Environmental and Experimental Botany* 78:47–55.[online] URL:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847211003212>
- Giordanengo P., Brunissen L., Rusterucci C., Vincent C., Van Bel A., Dinant S., Girousse C., Faucher M., Bonnemain J.-L. (2010) Compatible plant-aphid interactions: how aphids manipulate plant responses. *Comptes rendus biologies* 333:516–23. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541163> (accessed 3 March 2013).
- Giron, D., Huguet, E., Stone, G.N., Body, M. (2016) Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *J. Insect Physiol.*, 84, pp. 70-89
- Goldberg, E.E.R., Kohn, J.R., Lande, R., Robertson, K.A., Smith, S.A., Igic B. (2010) Species Selection Maintains Self-Incompatibility. *Science* 330:493–495.
- Graham, P.H., and C.P. Vance. 2003. Update on Legume Utilization Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. 131: 872–877. doi: 10.1104/pp.017004.872.
- Greenway, H., Munns R. (1980) Mechanism of salt tolerance in non halophytes. *Annual review of plant physiology* 31:149–190.
- Hayashi N., Kondo T., Ishihara M. (2005) Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I $\beta$  crystalline domains. *Carbohydrate Polymers* 61:191–197. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861705001608> (accessed 6 March 2013).



- Hématy, K., Cherk, C. and Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(4): 406–13. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.007.
- Hilker M, Fatouros NE. (2016). Resisting the onset of herbivore attack: plants perceive and respond to insect eggs. *Current Opinion in Plant Biology* 32, 9–16.
- Hocq, L. et al. (2017) Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends Plant Sci.* 22, 20–29.
- Hogenhout SA, Bos JIB. (2011). Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 422–28
- Howe G. A, Jander G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual review of plant biology* 59:41–66. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031220> (accessed 4 March 2013).
- Ismail, A., M. Riemann, and P. Nick. 2012. The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *J. Exp. Bot.* 63(5): 2127–39. doi: 10.1093/jxb/err426.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–9. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108957> (accessed 1 March 2013).
- Jung, H.G. and K.P. Vogel. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci.* 62:1703–1712.
- Jung, J., and S. McCouch. 2013. Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Front. Plant Sci.* 4:186. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00186>.
- Kade M, Pagani EA, Mendoza RE (2003) Phosphorus utilization efficiency in populations of narrow-leaf birdsfoot trefoil. *Commun Soil Sci Plant* 34:271–284
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J., Villarroel, C. A., Ataíde, L. M. S., Dermauw, W., Glas, J.J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Sabelis, M.W., Alba, J.M. (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities, *Annals of Botany*, Volume 115, Issue 7, Pages 1015–1051, <https://doi.org/10.1093/aob/mcv054>
- Kazan, K., Manners, J.M., (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, Volume 14, Issue 7, Pages 373–382, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.005>.
- Kerepesi, I., & Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 40(2), 482–487.
- Rayle, D.L. and Cleland, R. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* 46, 250–253

- Kesten, C., A. Menna, and C. Sánchez-Rodríguez. 2017. Regulation of cellulose synthesis in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40: 106–113. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.010.
- Khatkar, D. & Kuhad, M. (2000) Short-Term Salinity Induced Changes in Two Wheat Cultivars at Different Growth Stages. *Biologia Plantarum* Volume 43, Issue 4, pp: 629-632 <https://doi.org/10.1023/A:1002868519779>
- Kindt, F., Peters, D., Tjallingii, W.F., 2003. Characterization of the feeding behaviour of western flower thrips in terms of electrical penetration graph (EPG) waveforms. *J. Insect Physiol.* 49, 183–191.
- Krauss G-J, Nies D.H (2015) *Ecological biochemistry Environmental and Interspecies Interactions* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Boscstr.12, 69469 Weinham, Germany ISBN: 978-3-527-31650-2
- Leonforte A., Forster J.W., Redden R.J., Nicolas M.E., Salisbury P.A. (2012) Sources of high tolerance to salinity in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 189:203–216. [online] URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10681-012-0771-4> (accessed 3 April 2013).
- Le Gall H, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. (2015) Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* (Basel). 2015 Feb 16;4(1):112-66.doi: 10.3390/plants4010112.
- Lima, R.B.; Santos, dos, T.B.; Vieira, L.G.E.; de Lourdes Lúcio Ferrarese, M.; Ferrarese-Filho, O.; Donatti, L.; Boeger, M.R.T.; de Oliveira Petkowicz, C.L. Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea arabica* L.) leaf cells *Carbohydr. Polym.*, 112 (2014), pp. 686-694
- Lima, R.B.; Santos, dos, T.B.; Vieira, L.G.E.; de Lourdes Lúcio Ferrarese, M.; Ferrarese-Filho, O.; Donatti, L.; Boeger, M.R.T.; de Oliveira Petkowicz, C.L. (2013) Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). *Carbohydr. Polym.*, 93, 135–143.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. O. d. S. and Marquez U.M.L. (2002) Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research* 50:233–241.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Manchanda G., Garg N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:595–618. [online] URL: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11738-008-0173-3> (accessed 14 February 2013).

- Mangano, S., J. Martínez Pacheco, C. Marino-Buslje, and J.M. Estevez. 2018. How Does pH Fit in with Oscillating Polar Growth? *Trends Plant Sci.* 23(6): 479–489. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2018.02.008.
- Manzur, M.E. 2005. Bases ecofisiológicas relacionadas con la tolerancia a la inundación y la defoliación en especies conspicuas de pastizales húmedos.
- McCann M.C., Carpita N.C. (2008) Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current opinion in plant biology* 11:314–20. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486537> (accessed 4 March 2013).
- McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, and C.. Morgan. 2006. *Nutricion animal* 6° ed.
- Mendoza, R., Escudero, V., Garcia I. (2005) Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and soil* 275:305–315.
- Minson D. (1990) *Forage in ruminant nutrition*. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101.
- Miñón, D.P., G.H. Sevilla, L. Montes, and O. Fernandez. 1990. *Lotus tenuis*: Leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Universidad Integrada Balcarce. FCA-EEA Boletín Técnico Nro. 98. pp. 16.
- Mithofer A., Boland W. (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology*, 146, 825–831.
- Morse JG, Hoddle MS. 2006. Invasion biology of thrips. *Annual Review of Entomology* 51, 67–89. Mouden
- Mound LA. 2005. Thysanoptera: diversity and interactions. *Annual Review of Entomology* 50, 247–269. M
- Munns R. (1993) Physiological-processes-limiting-plant-growth-in-saline-soils-some-dogmas-and-hypotheses. *Plant, cell & environment* 16:15–24.
- Munns R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *The New phytologist* 167:645–63. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101905> (accessed 12 March 2013).
- Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology* 59:651–81.
- Munns, R., Schachtman, D.P., Condon A.G. (1995) The significance of a two phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:561–569.
- Munns, R., Termaat A. (1986) Whole plant response to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:143–160.

- Munns, R. and Gilliam, M. (2015), Salinity tolerance of crops – what is the cost?. *New Phytol*, 208: 668-673. doi:[10.1111/nph.13519](https://doi.org/10.1111/nph.13519)
- Naczek M., Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41:1523–42. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753277> (accessed 27 February 2013).
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., and Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33: 887–898.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N, Estelle, M., Voinnet, M.O., Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling *Science*, 312 (2006), pp. 436-439
- Nawaz, T., Hameed, M., Ashraf, M., Batool, S. & Naz, N (2013) Modifications in Root and Stem Anatomy for Water Conservation in Some Diverse Blue Panic (*Panicum antidotale* Retz.) Ecotypes Under Drought Stress, *Arid Land Research and Management*, 27:3, 286-297, DOI: [10.1080/15324982.2012.727947](https://doi.org/10.1080/15324982.2012.727947)
- Nuccio M.L., Rhodes D. M.N.S. y H.A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 2:128–134.
- Obata, T., Fernie A.R. (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69:3225–43. [online] URL:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3437017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 30 January 2013).
- Painter T.J. (1983) The polysaccharides. In: Aspinall GO (ed) *Academic P.* London, pp 196–285.
- Park J.T., Johnson M.J. (1949) A submicrodetermination of glucose. *The Journal of biological chemistry* 181:149–151. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-76549203762&partnerID=40&md5=bbf7ec17971b019b2ace77d401346698>
- Parida, A.K. y Das, A.B.. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60(3): 324–49. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010.
- Paz, R.C., H. Reinoso, F.D. Espasandin, F. a. González Antivilo, P. a. Sansberro, et al. 2014. Alkaline, saline and mixed saline-alkaline stresses induce physiological and morpho-anatomical changes in lotus tenuis shoots. *Plant Biol.* 3: 1042–1049. doi: 10.1111/plb.12156.
- Pesqueira J. (2009) Cambios bioquímicos , morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género Lotus bajo estrés salino. *Universitat Politècnica de Valencia*

- Pieterse, C. M., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. CAMBIAR CITA ZAMIOUDIS en estres biotici
- Posada, S. L., Noguera R.R. (2005) Técnica in vitro de producción de gases. *Livestock Research for Rural Development* 17 (4) 2005 17
- Pobozniak, M. 2011. The occurrence of thrips (thysanoptera) on food legumes (fabaceae). *J. Plant Dis. Prot.* doi: 10.1007/BF03356402.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15, 395–401.
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K., Watt, M.; A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient, *Journal of Experimental Botany*, Volume 62, Issue 1, 1 January 2011, Pages 69–77, <https://doi.org/10.1093/jxb/erq359>
- Ramirez Orduña, R., Ramirez Lozano, R.G., Lopez Gutierrez F. (2002) Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL V*
- Rengasamy, P., Chittleborough, D., Helyar K. (2003) Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. *Plant and Soil* 257:249–260.
- Roberts, M.A., Quemener B. (1999) Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis. *Trends in Food Science & Technology* 10:169–181. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224499000436>
- Rogers L. a., Campbell M.M. (2004) The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist* 164:17–30. [online] URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2004.01143.x> (accessed 27 March 2013).
- Roy, S.J., S. Negrão, and M. Tester. 2014. Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi: 10.1016/j.copbio.2013.12.004
- Ryan C.A. (2000) The systemin signaling pathway: diferencial activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:112–121.
- Sanchez D.H., Lippold F., Redestig H., Hannah M. a, Erban A., Krämer U., Kopka J., Udvardi M.K. (2008) Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 53:973–87. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047558> (accessed 14 February 2013).

- Sanchez D.H., Pieckenstain F.L., Escaray F., Erban A., Kraemer U., Udvardi M.K., Kopka J. (2011) Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant, cell & environment* 34:605–17. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21251019> (accessed 20 February 2013).
- Sanchez D.H., Szymanski J., Erban A., Udvardi M.K., Kopka J. (2010) Mining for robust transcriptional and metabolic responses to long-term salt stress: a case study on the model legume *Lotus japonicus*. *Plant, cell & environment* 33:468–80. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781009> (accessed 14 February 2013).
- Sanchez-Blanco M.J., Morales, M.A., Torrecillas A., Alarcón J.J. (1998) Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus creticus* plants grown under saline stress. *Plant science* 136:1–10.
- Sánchez-Rodríguez C., Rubio-Somoza I., Sibout R., Persson S. (2010) Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in plant science* 15:291–301. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346727> (accessed 10 March 2013).
- Sánchez- Díaz, M., and J. Aguirreolea. 2000. *Fundamentos de fisiología vegetal. Transporte de agua y balance hídrico en la planta.*
- Sauerland K., Plaas A.H., Raiss R.X., Steinmeyer J. (2003) The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1638:241–248. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443903000899> (accessed 10 April 2013).
- Schmelz E. a, Engelberth J., Alborn H.T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H., Tumlinson J.H. (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10552–7. [online] URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schmelz E. a, Engelberth J., Tumlinson J.H., Block A., Alborn H.T. (2004) The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39:790–808. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315639> (accessed 17 October 2013).
- Scott-Brown AS, Gregory T, Farrell IW, Stevenson PC. 2016. Leaf trichomes and foliar chemistry mediate defence against glasshouse thrips; *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché) in *Rhododendron simsii*. *Functional Plant Biology* 43, 1170–1182.
- Schuman, M. C. & Baldwin, I. T. The layers of plant responses to insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* **61**, 373–394 (2016).

- Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiologia plantarum* 132:199–208. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18251861> (accessed 30 January 2013).
- Singh, S.K., Sharma, H.C., Goswami, A.M., Datta, S.P., Singh, S.P., 2000. In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biol. Plant.* 43, 283–286.
- Singh, S.C., Sinha, R.P., Hader, D.P., 2002. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozool.* 41, 297–308. Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 :144–158. [online] URL: <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>
- Smith R.L., Gilkerson E. (1979) Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical Biochemistry* 98:478–480. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0018571099&partnerID=40&md5=a1d890878d8f87808b82fa53eaa2ff21>
- Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredez A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* (New York, NY) 306:2206–11. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618507> (accessed 10 March 2013).
- Steenbergen, M., A. Abd-El-Haliem, P. Bleeker, M. Dicke, R. Escobar-Bravo, et al. 2018. Thrips advisor: Exploiting thrips-induced defences to combat pests on crops. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/ery060.
- Stern M.D. (1991) Laboratory Manual Research Techniques in ruminant nutrition Dept. Animal Sciences. Univ Minnesota, Estados Unidos.
- Stevenson T.T., Furneaux R.H. (1991) Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research* 210:277–298. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026428333&partnerID=40&md5=54b42154ed18c9263633863528538c1d>
- Stofella, S., G. Posse, and M. Collantes. 1998. Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral.* (1948).
- Stortz C.A., Matulewicz M.C., Cerezo A.S. (1982) Separation and identification of O-acetyl-O-methyl-galactonitriles by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 111:31–39. [online] URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008621582850040>
- Striker G.G., Izaguirre R.F., Manzur M.E., Grimoldi a a (2012) Different strategies of *Lotus japonicus*, *L. corniculatus* and *L. tenuis* to deal with complete submergence

- at seedling stage. *Plant biology* (Stuttgart, Germany) 14:50–5. [online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21972978> (accessed 14 February 2013).
- Striker G.G., Manzur M.E., Grimoldi A. a. (2011) Increasing defoliation frequency constrains regrowth of the forage legume *Lotus tenuis* under flooding. The role of crown reserves. *Plant and Soil* 343:261–272. [online] URL: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11104-011-0716-z> (accessed 14 February 2013).
- Taylor R.L., Conrad H.E. (1972) Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry* 11:1383–1388. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0015502656&partnerID=40&md5=1eade1b399797fcb2faf2f67ef5be2ab>
- Teakle N.L.A., Snell A.A., Real D.A., Colmer T.D.A. (2010) Variation in salinity tolerance , early shoot mass and shoot ion concentrations within *Lotus tenuis* : towards a perennial pasture legume for saline land. *Crop and pasture science* 61:379–388.
- Teakle, N.L., Tyerman S.. (2010) Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant, cell & environment* 33:566–589.
- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., Mcallan A.B., France J. (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48:185–197.
- Tenhaken, R. 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 5(January): 1–9. doi: 10.3389/fpls.2014.00771.
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance, *Trends in Plant Science*, Volume 14, Issue 6, Pages 310-317,ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>.
- Turner S.H., Cherniak R. (1981) Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 95:137–144. [online] URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000423858&partnerID=40&md5=337b9a012457576eff48e709e338f55c>
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J.(2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants *Annual Review of Phytopathology* 2006 44:1, 135-162
- Van Soest P.J. (1994) *Nutritional ecology of the ruminant*(C.P. Associates, Ed.), 2nd edn. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Vadassery J, Reichelt M, Hause B, Gershenzon J, Boland W, Mithöfer A (2012) CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera*



- herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159:1159–1175.  
doi: [10.1104/pp.112.198150](https://doi.org/10.1104/pp.112.198150)
- Verhage A, van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2010. Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol*. 154: 536–40
- Vignolio, O.R., Maceira, N.O., Fernández O.. (1994) Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecología austral* 4:19–28.
- Vignolio. OR y Fernández, O.N. 2006. Bioecología de *Lotus glaber* Mill (Fabaceae) en la Pampa Deprimida (Pcia de Bs As, Argentina), *Revista de producción animal* 26:113/130, 2006.
- Vlot, A.C., Amick Dempsey, D., Klessig, D.F. (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 2009 47:1, 177-206
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in plant science* 9:203–209. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138504000512>
- Walters, D. & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71 , 3–17
- Walters, D.R., McRoberts, N. (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins?, *Trends in Plant Science*, Volume 11, Issue 12, Pages 581-586, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.003>.
- Walling L.L. (2000) The Myriad Plant Responses to Herbivores. *Journal of plant growth regulation* 19:195–216.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T. Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C. (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores, *Plant Signaling & Behavior*, 7:10, 1306-1320, DOI: [10.4161/psb.21663](https://doi.org/10.4161/psb.21663)
- Wasternack C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany* 100:681–97. [online] URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2749622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 18 October 2013).
- War, A.R., M.G.Paulraj, Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S y Sharma, S.C. (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores, *Plant Signaling & Behavior*, 7:10, 1306-1320, DOI: [10.4161/psb.21663](https://doi.org/10.4161/psb.21663)
- Wawrzkievicz M. (2010) “*Conocimientos y criterios para la evaluación de la calidad y concentración energética de los forrajes ensilados.*” Repositorio FAUBA

- Wolters, H., Jurgens G. (2009) Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat rev genet* 10:305–317.
- Wu, J., and I.T. Baldwin. 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* 44: 1–24.
- Zavala J.A., Baldwin I.N.T. (2006) Jasmonic acid signalling and herbivore resistance traits constrain regrowth after herbivore attack in *Nicotiana attenuata*. 1:1751–1760.
- Zavala J.A., Casteel C.L., Delucia E.H., May R., Christensen T.R., Mastepanov M., Nielsen R., Munch K., Brand T., Gilbert M.T.P., Maria T., Bunce M., Rønn R., Gilichinsky D. (2008) Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. 105
- Zavala J.A., Patankar A.G., Gase K., Baldwin I.T. (2004) Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1607–12. [online] URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=341788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zelaya, V.M., P.V. Fernández, A.S. Vega, A.I. Mantese, A.A. Federico, et al. 2017. Glucuronoarabinoxylans as major cell walls polymers from young shoots of the woody bamboo *Phyllostachys aurea*. *Carbohydr. Polym.* 167: 240–249. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.03.015.
- Zhen, A., Z. Bie, Y. Huang, Z. Liu, and B. Lei. 2011. Effects of salt-tolerant rootstock grafting on ultrastructure, photosynthetic capacity, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging system in chloroplasts of cucumber seedlings under NaCl stress. *Acta Physiol. Plant.* doi: 10.1007/s11738-011-0771-3.
- Züst T, Agrawal AA. 2017. Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis. *Annual Review of Plant Biology* 68, 513–534.
- Zuther, E., Koehl, K., Kopka J. (2007) Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice. In: Jenks, M. A., Hasegawa, PM. JSM (ed) Springer. Berlin, pp 285–315.

# Apéndice

Tallo Testigo Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	9,4	47,44±1,2	20,8±0,5
H2O S2	4,1	51,7±0,7	16,9±1,6
CDTA S1	6,8	57,7±0,4	51,1±0,8
CDTA S2	3,1	43,8±2,2	33,8±1,5
Na2CO3 S1	3,1	70,6±2,8	58,9±2,9
Na2CO3 S2	2	58,7±2,2	59,0±2,3
KOH 1M S1	6,6	99,9±1,1	57,1±1,0
KOH 1M S2	2,8	69,52±2,6	31,1±0,5
KOH 4M S1	3,7	69,5±3,2	20,6±0,11
KOH 4M S2	1,5	50,7±3,4	17,2±0,7
KOH 4M residuo	34,7	90,9±1,5	24,0±0,2
KOH 4M S3	2,21	68,75±0,8	35,1±0,81
KOH 4M residuo 3	32,64	80,2±0,8	25,2±1,1

Cuadro 14: Rendimiento obtenido en tallos testigo tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.

Tallo D1 Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	11,2	42,18±0,4	9,8±0,86
H2O S2	3,9	44,6±1,3	11,4±0,7
CDTA S1	3,4	47,6±0,7	39,5±2,3
CDTA S2	3	39,1±0,26	23,6±1,6
Na2CO3 S1	3,5	89,9±0,9	68,3±2,6
Na2CO3 S2	2	59,3±0,9	51,5±1,2
KOH 1M S1	13,9	92,75±1,4	31,3±1,6
KOH 1M S2	6,9	79,6±1,9	41,4±0,25
KOH 4M S1	4,5	86,6±0,5	30,0±1,5
KOH 4M S2	3,3	58,9±0,3	26,0±0,3
KOH 4M residuo	32,8	96,3±2,1	23,4±0,2
KOH 4M S3	1,65	72,3±0,18	31,9±0,18
KOH 4M residuo 3	30,57	72,2±3,2	21,6±0,6

Cuadro 15: Rendimiento obtenido en tallos dosis 1 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.

Tallo D2 Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	10,2	49,82±0,3	14,1±1,4
H2O S2	7	47,2±0,5	11,4±1,0
CDTA S1	4,5	50,2±1,6	37,0±1,58
CDTA S2	3,2	33,9±0,6	30,7±0,6
Na2CO3 S1	4,2	56,6±0,8	57,2±1,6
Na2CO3 S2	1,9	71,9±1,9	53,1±1,8
KOH 1M S1	13,3	72,8±1,3	22,6±0,5
KOH 1M S2	3	62,7±2,6	28,7±0,12
KOH 4M S1	7,1	94,5±1,1	32,6±1,6
KOH 4M S2	3,7	68,3±0,5	26,7±1,1
KOH 4M residuo	25,7	100,6±3	23,5±0,7
KOH 4M S3	2,2	93,40±0,5	47,3±0,1
KOH 4M residuo 3	24,04	79,50±3,4	18,8±0,4

Cuadro 16: Rendimiento obtenido en tallos dosis 2 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.

Hoja Testigo Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	6,8	18,9±0,3	7,4±0,4
H2O S2	5,3	26,1±1,0	7,3±0,6
CDTA S1	4,5	43,8±1,2	34,24±0,4
CDTA S2	4,1	68,8±0,5	63,3±0,35
Na2CO3 S1	4	50,8±0,7	31,25±0,7
Na2CO3 S2	1,4	45,7±1,0	20,9±1,2
KOH 1M S1	18,4	20,6±0,5	9,7±0,2
KOH 1M S2	3,8	28,3±0,4	12,9±0,2
KOH 4M S1	21,1	101,5±1,5	61,3±0,9
KOH 4M S2	7,4	99,18±2,9	60,2±2
KOH 4M residuo	99,6	94,41±3,4	31,7±1,5
KOH 4M S3	5,4	70,9±0,3	40±0,5
KOH 4M residuo 3	89,2	64,38±0,1	17,7±0,3

Cuadro 17: Rendimiento obtenido en hojas testigo tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.

Hoja D1 Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	10	24,4±1,7	7,5±0,01
H2O S2	7,8	30,4±0,3	7,3±0,3
CDTA S1	3	54,9±0,1	42,8±0,35
CDTA S2	4,5	52,4±0,3	49,2±0,3
Na2CO3 S1	4,5	49,6±3,1	31,2±0,1
Na2CO3 S2	1,7	40,7±1,2	21,5±0,7
KOH 1M S1	15,5	39,3±0,5	11,1±0,7
KOH 1M S2	8,1	36,9±2,2	14,0±0,3
KOH 4M S1	11,6	97,2±0,7	41,7±1,1
KOH 4M S2	5,8	96,1±2,0	58,4±1,6
KOH 4M residuo	108,7	91,7±0,2	27,7±1,4
KOH 4M S3	8,4	77,6±1,5	42,4±0,6
KOH 4M residuo 3	90,6	66,5±0,6	16,9±0,6

Cuadro 18: Rendimiento obtenido en hojas dosis 1 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.

Hoja D2 Tolerante			
	% referido muestra inicial	Azúcares totales %	Urónicos %
H2O S1	14,6	21,6±1,2	6,5±0,6
H2O S2	4	29,4±0,5	6,5±0,5
CDTA S1	3,9	59,8±1,0	52,9±0,1
CDTA S2	2,4	50,9±0,3	43,0±0,8
Na2CO3 S1	3,8	62,3±1,5	40,0±0,9
Na2CO3 S2	1,8	63,5±2,5	33,8±0,8
KOH 1M S1	13,2	32,3±0,5	13,5±0,4
KOH 1M S2	9,7	41,9±1,6	13,1±1,6
KOH 4M S1	14,8	97,1±6,0	47,0±1,6
KOH 4M S2	9,9	97,4±5,6	54,5±0,3
KOH 4M residuo	100,5	91,4±1,8	25,9±0,1
KOH 4M S3	9	79,1±0,7	45,4±0,8
KOH 4M residuo 3	86,8	71,7±0,9	21,6±0,18

Cuadro 19: Rendimiento obtenido en hojas dosis 2 tolerante en porcentaje referido a la muestra inicial, % de azúcares totales y neutros para los extractos de agua caliente, soluciones de CDTA y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M, soluciones acuosas de KOH 1M, KOH 4M y en el residuo final. Para azúcares totales y urónicos se presentan las medias ± DE.